

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

BIOCAPTEUR PLASMONIQUE À SÉLECTIVITÉ ACCRUE BASÉ SUR DES
INTERRUPTEURS BIO-ÉLECTROCHIMIQUES

ANNE-MARIE DALLAIRE

DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE PHYSIQUE)

AVRIL 2015

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

BIOCAPTEUR PLASMONIQUE À SÉLECTIVITÉ ACCRUE BASÉ SUR DES
INTERRUPTEURS BIO-ÉLECTROCHIMIQUES

présenté par : DALLAIRE Anne-Marie

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Mme SANTATO Clara, Doctorat, présidente

M. MEUNIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. VALLÉE-BÉLISLE Alexis, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. MASSON Jean-François, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont naturellement à mon directeur de recherche, Pr Michel Meunier, pour m'avoir offert ma première chance au *Laboratoire de Plasmonique et de Procédés par Laser* à l'été 2010, et pour son support continu au cours des cinq années suivantes passées au sein de son groupe de recherche.

Je remercie également mon co-directeur Pr Alexis Vallée-Bélisle pour m'avoir guidée dans la réalisation de ce projet et pour m'avoir généreusement offert ses conseils et son temps.

Merci aux membres du personnel Yves Drolet et spécialement Sergiy Patskovsky, qui m'ont offert un précieux soutien technique et scientifique et sans qui je n'aurais jamais pu compléter le projet.

Merci à mes collègues de laboratoire Mathieu Maisonneuve, André-Pierre Blanchard-Dionne, Laurent Doré-Mathieu, Vincent Latendresse, David Rioux, et à tous les autres étudiants du LP²L, avec qui j'ai beaucoup aimé travailler et échanger des idées.

Merci au Pr Francesco Ricci pour m'avoir si bien accueillie et encadrée au cours de mon stage à l'Université Tor Vergata et à ses étudiants Erica Del Grosso, Marianna Rossetti, Simona Ranallo et Alessandro Porchetta.

Finalement, un grand merci à mes amis de génie physique et d'ailleurs, à ma famille et particulièrement à ma mère, pour leur soutien continu et inconditionnel.

RÉSUMÉ

Les biocapteurs basés sur la résonance du plasmon de surface (SPR) connaissent beaucoup de succès dans la recherche pharmaceutique et en sciences biologiques comme des outils bio-analytiques sensibles et puissants. Cependant, malgré plus de trente ans de développement, ils ont trouvé peu d'applications à l'extérieur des laboratoires de recherche et peinent à atteindre leur plein potentiel en tant que biocapteurs pour utilisation délocalisée. Bien que les avancements technologiques dans les domaines de l'optique et de la micro-fabrication aient rendu possible l'intégration de capteurs SPR sensibles dans un format portable et à faibles coûts, leur performance est toujours limitée par leur faible sélectivité. En effet, les capteurs SPR discriminent difficilement le signal spécifique provenant des ligands d'intérêt du signal non-spécifique provenant des contaminants dans l'échantillon, ce qui résulte en de faux positifs qui compliquent leur utilisation pour la détection dans des échantillons non purifiés.

Ce projet de maîtrise étudie une nouvelle solution pour améliorer la sélectivité des biocapteurs SPR dans des milieux complexes. L'approche est basée sur un mode de transduction qui intègre l'électrochimie et la SPR (eSPR) de façon à discriminer la réponse du biomarqueur des contributions non-spécifiques de l'échantillon. La performance du biocapteur repose sur la combinaison originale d'un élément de reconnaissance de type interrupteurs bio-électrochimiques (E-ADN) qui produit la signalisation et d'un marqueur optique bleu de méthylène dont les propriétés sont contrôlées par un processus électrochimique.

Une plateforme de détection multiparamétrique incluant une cellule de mesure électrochimique, un dispositif SPR en configuration Kretschmann et un détecteur optique couplé à un amplificateur lock-in (eSPR) a été développée pour étudier les propriétés électrochimiques, plasmoniques et électro-plasmoniques des E-ADN. Cette plateforme facilite l'analyse et la confirmation des données obtenues avec la transduction eSPR en permettant de les comparer directement avec les méthodes bien établies de la SPR et de l'électrochimie. La sensibilité du système eSPR en fonction de l'angle d'incidence et de l'indice de réfraction du milieu de test a été caractérisée.

L'approche a été validée dans un contexte de bio-détection avec deux séquences d'oligonucléotides associées à la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* résistante à la rifampicine

et à la bactérie *E-coli*. Les courbes d'étalonnage pour les deux séquences d'oligonucléotides cibles ont été mesurées dans une solution tampon purifiée et une limite de détection de 5 nM a été obtenue sur le système eSPR. Les échantillons de tests sont réutilisables, avec un signal réversible pour au moins 5 cycles de régénération par un rinçage à l'urée.

L'approche a ensuite été testée dans un milieu non-purifié en comparant les réponses mesurées suite à l'ajout de la cible d'oligonucléotide dans une solution tampon et dans un échantillon de sang de bœuf. Les résultats préliminaires ont montré que les réponses sont corrélées dans les deux milieux et correspondent aux réponses mesurées en parallèle sur un système électrochimique. La possibilité de détection en format multiplexé sur une même électrode a également été démontrée en mesurant la réponse eSPR provenant de deux taches de détection fonctionnalisées avec deux récepteurs distincts.

Les résultats obtenus dans ce projet suggèrent que l'approche de détection eSPR combinée aux E-ADN permet d'améliorer la sélectivité de la détection plasmonique dans les milieux complexes. Elle est aussi adaptable en un format multiplexé et ses échantillons peuvent être régénérés. Cependant, elle comporte aussi des points à améliorer, notamment un besoin de recalibration dans des milieux à indice de réfraction fortement contrastés et une sensibilité à la force ionique, qui pourraient être investigués et améliorés dans des études futures.

ABSTRACT

Biosensors based on surface plasmon resonance (SPR) have proven extremely useful in pharmaceuticals and life sciences research as sensitive and powerful bio-analytical devices. However, after over 30 years of development, they have found limited applications outside research laboratories and have yet to achieve their full potential as biosensors for point-of-care use. While technological advancements in the fields of optics and microfabrication have made possible the integration of SPR sensors in a portable and low-cost format, their effectiveness is still limited by their lack of selectivity. Indeed, most SPR sensors fail to discriminate between the specific signal produced by the targeted ligand and the non-specific signal of contaminants in the sample matrix, resulting in false positives that complicate their application for biosensing in crude samples.

This Master's thesis investigates a new solution to increase the selectivity of SPR sensors in complex media. The approach is based on a transducer that integrates electrochemistry and SPR in order to differentiate between the ligand binding response and the non-specific contributions of the sample. The efficiency of this method relies on the original combination of a bio-electrochemical reconnaissance element (E-ADN) that produces the signalisation and an optical marker whose properties are controlled with an electrochemical reaction.

A multi-parametric platform combining an electrochemical measuring cell, a SPR system in a Krestchmann configuration and an optical detector coupled to a lock-in amplifier (eSPR) was developed to study the electrochemical, plasmonic and electro-plasmonic properties of the E-ADN. This platform facilitates the analysis and confirmation of the data obtained with eSPR by comparing them with the well-established methods SPR and electrochemistry. The sensitivity of the eSPR system as a function of incident angle and refractive index of the media have been characterized.

This approach was validated for the detection of two oligonucleotide sequences associated with rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* and *E-coli* bacteria. Calibration curves for the two sequences were measured in a purified buffer solution and a limit of detection of 5 nM was obtained with eSPR. The test chips are reusable and have shown reversible signal for at least 5 cycles of regeneration with a urea wash.

The approach was then tested in an unpurified media by comparing the responses after addition of the target oligonucleotide in buffer media and in whole bovine blood. Preliminary results show that the responses are correlated in both media and correspond to the responses obtained simultaneously with electrochemistry. The possibility for biodetection in a multiplexed format was also demonstrated by measuring the eSPR responses from two detection spots functionalized with different receptors.

The results obtained in this project suggest that the eSPR biodetection approach combined with E-ADN increases the selectivity of plasmonic detection in complex media. It can also be adapted in a multiplexed format and the samples can be regenerated. However, certain issues should be investigated and fixed in future work, namely the need to recalibrate in media with highly contrasted refractive index and sensitivity to ionic force.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES ANNEXES	XVIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIX
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Concepts de base de la bio-détection	2
1.2 Problématique.....	4
1.3 Solution proposée.....	6
1.4 Objectifs du projet de recherche.....	9
1.5 Plan du mémoire.....	9
CHAPITRE 2 THÉORIE ET REVUE DE LITTÉRATURE.....	11
2.1 Bio-détection basée sur des interrupteurs bio-électrochimiques.....	11
2.1.1 Survol	11
2.1.2 Exemples d'application en bio-détection.....	12
2.1.3 Procédé de fabrication	14
2.1.4 Bases théoriques de l'électrochimie des interrupteurs bio-électrochimiques	15
2.1.5 Avantages des biocapteurs basés sur les interrupteurs bio-électrochimiques	25

2.2	Bio-détection basée sur la SPR électrochimique.....	26
2.2.1	Survol	27
2.2.2	Bases théoriques de la résonance du plasmon de surface	28
2.2.3	Modélisation des événements de bio-reconnaissance avec la SPR.....	37
2.2.4	Cas d'un milieu diélectrique absorbant.....	39
2.2.5	Mécanisme de détection eSPR	40
2.2.6	Correspondance entre les méthodes électrochimiques et la eSPR	44
2.2.7	Applications et avantages du eSPR.....	47
CHAPITRE 3 ARTICLE 1: ELECTROCHEMICAL PLASMONIC SENSING SYSTEM FOR HIGHLY SELECTIVE MULTIPLEXED DETECTION OF BIOMOLECULES BASED ON REDOX NANOSWITCHES.....		50
3.1	Authors	50
3.2	Abstract	50
3.3	Introduction	51
3.4	Materials and methods	52
3.4.1	Materials.....	52
3.4.2	Sensor preparation.....	53
3.4.3	Experimental set-up.....	55
3.5	Results and discussion.....	55
3.5.1	eSPR structure switching sensor	55
3.5.2	Measurements in whole blood.....	60
3.5.3	Multiplexing and differential measurements.....	62
3.5.4	eSPR calibration and effect of non-specific interactions	63
3.6	Conclusion.....	65

3.7	Acknowledgement.....	65
CHAPITRE 4 CARACTÉRISATION ET DISCUSSION GÉNÉRALE.....		66
4.1	Caractérisation de la densité de fonctionnalisation	66
4.1.1	Modélisation plasmonique	67
4.1.2	Modélisation électrochimique	70
4.2	Détection avec la phase eSPR	72
4.3	Limites du système eSPR.....	73
4.3.1	Dépendance de l'angle d'interrogation et de la permittivité du milieu	73
4.3.2	Influence de la force ionique	75
4.3.3	Correction du bruit et de la dérive du signal	79
4.4	Discussion générale.....	81
CHAPITRE 5 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....		83
5.1	Synthèse des travaux et principales contributions.....	83
5.2	Limites de l'approche	84
5.3	Recommandations et perspectives	85
RÉFÉRENCES.....		87
ANNEXE		97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1: Recouvrement et densité de fonctionnalisation en fonction de la concentration de la solution d'E-ADN caractérisés par SPR.....	70
Tableau 4.2 : Variations d'indice de réfraction et facteurs de correction correspondants pour différentes concentrations de PBS.....	78
Tableau A1.1 : Valeurs approximées de n et κ pour la couche de MB à 633 nm.....	99

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Schématique d'un biocapteur et considérations opérationnelles pour chaque sous-section.....	2
Figure 1.2 : Schématique du problème de sélectivité des capteurs SPR.....	5
Figure 1.3 : Schéma de la signalisation des interrupteurs bio-électrochimiques, où le transfert d'électrons est possible dans la conformation "ON", mais impossible lorsque le récepteur adopte une conformation "OFF" suite à la reconnaissance de la cible.	7
Figure 1.4 : Schéma de l'absorption du bleu de méthylène dans son état oxydé (MB_{ox} , ligne pleine) et dans son état réduit (MB_{red} , ligne pointillée).	8
Figure 1.5 : Schéma d'un système de mesure basé sur une transduction électro-plasmonique.....	9
Figure 2.1 : a) Balises moléculaires fluorescentes. b) Interrupteurs bio-électrochimiques.	12
Figure 2.2 : Schéma du protocole de fonctionnalisation des interrupteurs bio-électrochimiques sur une électrode d'or.	15
Figure 2.3 : Configuration typique d'une cellule électrochimique comprenant une électrode de travail (WE), une électrode de référence (REF) et une contre-électrode (C-E) et le circuit équivalent du système de mesure	17
Figure 2.4 : Réaction d'oxydoréduction entre l'état oxydé et réduit du marqueur rédox bleu de méthylène.	18
Figure 2.5 : Les deux mécanismes limitant du transfert d'électrons dans les interrupteurs bio-électrochimiques: limité par le k_{et} à travers la monocouche dans la configuration ON, limité par le taux d'approche à l'électrode k_1 dans la configuration OFF.....	18
Figure 2.6 : Circuits équivalents de la cellule électrochimique des interrupteurs bio-électrochimiques à a) $E_{app} \neq E_0$ et b) à $E_{app} = E_0$	21
Figure 2.7 : a) Potentiel appliqué en fonction du temps en voltampérométrie cyclique. b) Voltammogramme typique pour une monocouche autoassemblée rédox.....	22

Figure 2.8 : Voltammogramme cyclique pour un échantillon modifié avec des interrupteurs bio-électrochimiques contenant un reporteur bleu de méthylène.	23
Figure 2.9 : a) Haut: Potentiel appliqué en fonction du temps en voltampérométrie à courant alternatif. Bas: Courant alternatif résultant de l'application du potentiel alternatif, avec un pic d'amplitude au potentiel rédox E_o . b) Voltammogramme à courant alternatif typique pour une surface modifiée avec des E-ADN.	24
Figure 2.10: Schéma du ratio i_p/i_b en fonction de la fréquence pour des interrupteurs en configuration ON (sans cible) et OFF (avec cible).	25
Figure 2.11 : Différentes structures et modes de couplage SPR. a) Film métallique planaire. b) Réseau de nanotrous métalliques en transmission. c) Réseau de diffraction. d) Nanoparticules d'or colloïdales.	28
Figure 2.12 : Géométrie du guide d'onde à l'interface entre l'or et le diélectrique.	29
Figure 2.13 : Parties réelles et imaginaires de la permittivité pour l'or et l'argent (données tirées de [83]).	32
Figure 2.14 : a) Longueur de propagation et b) profondeur de pénétration dans le milieu diélectrique en fonction de la longueur d'onde pour l'or et l'argent dans l'air.	33
Figure 2.15 : Courbes de dispersion de la lumière et du plasmon de surface dans l'air.	34
Figure 2.16 : Géométrie du couplage onde électromagnétique et plasmon de surface en présence d'un prisme coupleur.	35
Figure 2.17 : Courbes de dispersion de la lumière et des plasmons de surface en configuration Kretschmann pour différents angles d'incidence et différents milieux diélectriques.	36
Figure 2.18 : Spectres de la réflectivité dans l'eau en fonction de a) l'angle d'incidence et b) la longueur d'onde. c) Spectres de la réflectivité en fonction de l'angle pour un milieu d'eau et une mince couche d'indice 1.343 de différentes épaisseurs (0, 10 et 50 nm).	38
Figure 2.19 : Coefficient d'absorption molaire du bleu de méthylène oxydé en fonction de la longueur d'onde (données tirées de [88]).	39

Figure 2.20 : Courbes de réflexion pour un milieu diélectrique avec un indice de réfraction imaginaire κ non-nul (partie réelle n constante).	40
Figure 2.21 : Schéma de la contribution faradique à la réponse SPR dans le cas d'interrupteurs bio-électrochimiques.	41
Figure 2.22 : Schéma de la capacité double-couche à l'interface entre l'électrode et le liquide électrolytique.	43
Figure 2.23 : a) Voltammogramme cyclique mesuré par un potentiostat. b) Contributions faradique et non-faradique sur le signal SPR lors d'un voltammogramme cyclique. c) Angle SPR mesuré en fonction du potentiel lors d'un voltammogramme cyclique.....	45
Figure 2.24 : Voltampérométrie à courant alternatif tel que mesuré par SPR.	46
Figure 2.25 : Principe d'interrogation à angle fixé pour mesurer la réponse SPR à des fréquences élevées. La variation d'intensité ΔI est corrélée à la variation d'angle $\Delta\theta$	47
Figure 3.1: a) Schematic of the nanoswitches signalization mechanism. When the target binds the immobilized probe, the switch undergoes a conformational change from the "ON" state to the "OFF" state that increases the distance between the methylene blue reporter (blue sphere) and the electrode, hindering the electron transfer process. b) Schematic of the multi-parametric plasmonic biosensor for the detection of oligonucleotides assisted with electrochemical nanoswitches. A potentiostat is used to measure electrochemical voltammograms (i) and apply the voltage on the gold surface. The light containing plasmonic information is collected in two ways. First, a collimated beam is detected on a CCD camera to obtain the full angular/intensity dependency used in conventional angular SPR sensing (ii). Second, light from a fixed angle is sent on a photodetector. The average intensity measured by this Si detector is the SPR curve intensity at fixed angle (DC component). The detector is also coupled to a lock-in amplifier to obtain the eSPR signal (AC component) (iii). The inset graph shows the relation between the full SPR curve and the eSPR signal as the refractive index is modulated.	54
Figure 3.2: a) Schematic of the nanoswitches detection based on the refractive index (RI) changes of the methylene blue (MB) layer. Depending on the ON/OFF state of the switches, more or	

less MB will be oxidized and reduced as the potential V is swept across the reduction potential V_{redox} . The effective refractive index variation ΔRI_{redox} will therefore be high in the ON state and low in the OFF state. b) Refractive index changes induced by a potential sweep on a Nanoswitch_1-modified surface in its ON state (i.e. without target) and on a MCH-modified sample. c) Schematic of the eSPR AC voltammetry methodology showing the potential applied to the surface (up) and the resulting eSPR signal and amplitude (down). d) eSPR AC voltammograms measured experimentally for a Nanoswitch_1-modified surface and a MCH-modified surface. For comparison, an electrochemical voltammogram obtained from the same Nanoswitch_1 modified surface is shown (inset).....57

Figure 3.3: Nanoswitches activation by complementary oligonucleotides. a) eSPR AC voltammograms of a sensor functionalized with Nanoswitch_1 for different Target_1 concentrations. As the target concentration is increased, the switches are turned off and the amplitude of the eSPR redox peak decreases. b) Dose-response curves for the Nanoswitch_1-functionalised sensor with Target_1 (black) and for the Nanoswitch_2-functionalised sensor with Target_2 (red). Responses observed with eSPR (circles, solid line) and electrochemistry (filled circles, dashed line) were concordant. All responses were measured using AC cyclic voltammetry (50 mV, 100 Hz) and normalized in relation to their maximum attenuation. c) Real-time hybridization dynamics for various concentrations of Target_1 obtained with an eSPR impedance method (black). The kinetics were fitted with decaying exponential (red). d) Regeneration of the sensor surface with 8M urea.....59

Figure 3.4: a) Normalized eSPR voltammograms of a Nanoswitch_2-modified gold surface in PBS and whole blood media. Voltammograms were acquired before and after 40 minutes incubation with the target oligonucleotide Target_2. b) Real-time eSPR dynamics of hybridization between Nanoswitch_2 and Target_2.....61

Figure 3.5: a) Multiplexed eSPR set-up. Nanoswitch_1 and Nanoswitch_2 are immobilized on two separated spots of the same working electrode immersed in the same liquid sample. b) 100 nM Target_1 and Target_2 are subsequently added to the testing media.....63

Figure 3.6: Theoretical SPR angular intensity dependences (dashed) for 50 nm gold film in a water medium (black line) and shifted by 10^{-2} RIU changes (blue line). Solid lines provide

the eSPR calibration parameter that corresponds to the normalized SPR curve derivative. As eSPR is measured at a fixed incident angle (dotted line), the eSPR amplitude will be affected by the bulk RI. Inset: Calibration parameter dependence on the bulk RI.64

Figure 4.1 : Schéma de l'organisation des interrupteurs bio-électrochimiques à la surface de l'électrode en fonction de la densité d'oligonucléotides à la surface67

Figure 4.2 : Sensogrammes de l'immobilisation de différentes concentrations de solution d'interrupteurs sur une surface d'or mesuré par SPR angulaire. 1- Ligne de base dans la solution tampon, 2- Ajout de la solution de E-ADN et immobilisation, 3- Nettoyage avec la solution tampon.68

Figure 4.3 : Modélisation optique des interrupteurs bio-électrochimiques dans la configuration ON et OFF.69

Figure 4.4 : Densité de fonctionnalisation en fonction de la concentration de la solution de E-ADN utilisée tel que modélisé par SPR.70

Figure 4.5 : a) Voltammogramme cyclique mesuré sur une surface fonctionnalisée avec des interrupteurs. b) Charge négative fournie par l'électrode pendant la réduction du MB en fonction du voltage.71

Figure 4.6 : Densité de fonctionnalisation en fonction de la concentration de la solution de E-ADN utilisée tel que modélisé par électrochimie.72

Figure 4.7 : Informations sur la phase eSPR. a) Amplitude et phase eSPR normalisée lors d'une mesure de voltampérométrie AC. b) Détection en temps réel avec l'amplitude et la phase. .73

Figure 4.8 : Graphiques de l'intensité SPR et de l'amplitude eSPR en fonction de l'angle a) modélisé et b) obtenu expérimentalement.74

Figure 4.9 : Amplitude eSPR AC comparée au pic SPR en variant les paramètres κ et n du MB_{ox}75

Figure 4.10 : Voltammogrammes AC électrochimiques pour une surface modifiée avec des interrupteurs immergés dans différentes concentrations de tampon phosphate salin.77

Figure 4.11 : a) Voltammogrammes AC plasmoniques pour une surface modifiée avec des interrupteurs immergée dans différentes concentrations de tampon phosphate salin. b) Voltammogrammes AC plasmoniques corrigées pour les variations d'indice de réfraction..77

Figure 4.12 : a) Amplitude et b) potentiel des pics d'oxydo-réduction des voltammogrammes électrochimiques (noir) et plasmoniques (rouge). Les valeurs d'amplitude plasmoniques ont été corrigées par rapport au paramètre de calibration de l'indice de réfraction.....78

Figure 4.13 : Bruit et dérive du signal. a) Amplitude eSPR (noir) et intensité optique (rouge) mesurées. b) Exemple de correction pour la dérive du signal.....80

Figure A1.1 : a) Pics SPR mesurés dans des solutions de bleu de méthylène de 0, 5, 50, 500, 5000 et 30 000 μM . b) Indices de réfraction estimés en fonction de la concentration de MB oxydé dans du PBS à 633 nm.....98

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Propriétés optiques du bleu de méthylène	97
---	----

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AC	Courant alternatif
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
C-E	Contre-électrode
E-ADN	Interrupteurs bio-électrochimiques (électrochimique-ADN)
eSPR	SPR électrochimique (electrochemical SPR)
LOD	Limite de détection
MB	Bleu de méthylène
MB _{ox}	Bleu de méthylène oxydé
MB _{red}	Bleu de méthylène réduit
MCH	6-Mercapto-1-Hexanol
PBS	Tampon phosphate salin
RI	Indice de réfraction
RIU	Unité d'indice de réfraction
Rédox	Oxydoréduction
REF	Électrode de référence
SP	Plasmon de surface (Surface Plasmon)
SPR	Résonance du plasmon de surface (Surface Plasmon Resonance)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
WE	Électrode de travail (Working Electrode)

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Les biocapteurs sont des instruments analytiques qui comprennent un élément de détection biologique [1]. Ils unissent la spécificité et la sensibilité des réactions biologiques avec la précision et le potentiel des technologies de transduction physicochimiques. Ce qui distingue les biocapteurs des instruments bio-analytiques utilisés dans les laboratoires est leur caractère portable et à faibles coûts. En effet, la première motivation derrière leur développement est la perspective d'obtenir des résultats d'analyse sur le terrain sans devoir recourir à un personnel qualifié. Par exemple, le déploiement de tels dispositifs pour effectuer des tests immunologiques ou des tests d'acides nucléiques dans des pays en développement est critique pour améliorer le dépistage et le traitement de maladies telles que le VIH ou la tuberculose [2]. Leurs applications potentielles dépassent toutefois les analyses médicales et couvrent des domaines aussi variés que la toxicologie légale [3], la sécurité agro-alimentaire [4, 5] et la surveillance environnementale [6], et il est prévu que la demande pour ces dispositifs va croître considérablement dans les prochaines années, avec un marché global atteignant 20.7 milliards \$ en 2020 selon *Global Industry Analysts* [7].

Décrite en 1962 [8], l'électrode enzymatique appliquée pour la détection de glucose dans le sang est considérée comme le premier biocapteur moderne. Suite à l'immense succès de ce capteur pour le traitement du diabète, le domaine de la bio-détection continue de s'élargir et de gagner l'intérêt des chercheurs, avec une croissance de recherche soutenue durant les 20 dernières années [9]. Parmi toutes les technologies de bio-détection existantes, celle qui a connu le plus grand effort de développement est probablement la résonance du plasmon de surface (SPR: *Surface Plasmon Resonance*) [1]. Depuis la première démonstration de détection de gaz basée sur la SPR en 1983 [10], les technologies plasmoniques occupent une place centrale dans le domaine en raison de leur détection sensible, rapide, quantifiée, en temps-réel, et de leur possibilité d'automation et de multiplexage [11]. Le fonctionnement de ces dispositifs est basé sur la sensibilité à la permittivité des plasmons de surface, phénomène qui permet de détecter optiquement la capture de très faibles concentrations de biomolécules sur une surface d'or. Plusieurs dispositifs SPR ont été commercialisés avec succès pour des applications en pharmaceutique et en recherche, notamment le populaire BIAcore™.

Bien qu'ils aient définitivement trouvé leur place dans les laboratoires de recherche comme des instruments bio-analytiques robustes et fiables, les biocapteurs SPR ne sont toujours que très peu utilisés pour des applications cliniques. La principale raison pour ceci est que les senseurs SPR souffrent d'un problème de sélectivité, ce qui limite leurs performances dans des milieux complexes cliniquement pertinents [12]. Pour être en mesure de saisir l'origine et l'importance de ce problème, il faut s'intéresser au fonctionnement d'un biocapteur.

1.1 Concepts de base de la bio-détection

S'il existe une grande variété d'approches et de technologies utilisées dans les biocapteurs, leur structure opérationnelle peut toujours être fractionnée en deux principales branches: la reconnaissance biomoléculaire, par laquelle un élément de reconnaissance biologique sonde l'échantillon pour y capturer son ligand spécifique, et la détection et lecture, où l'événement de reconnaissance est traduit par un transducteur physicochimique en un signal traitable dont une réponse significative peut être extraite (Figure 1.1).

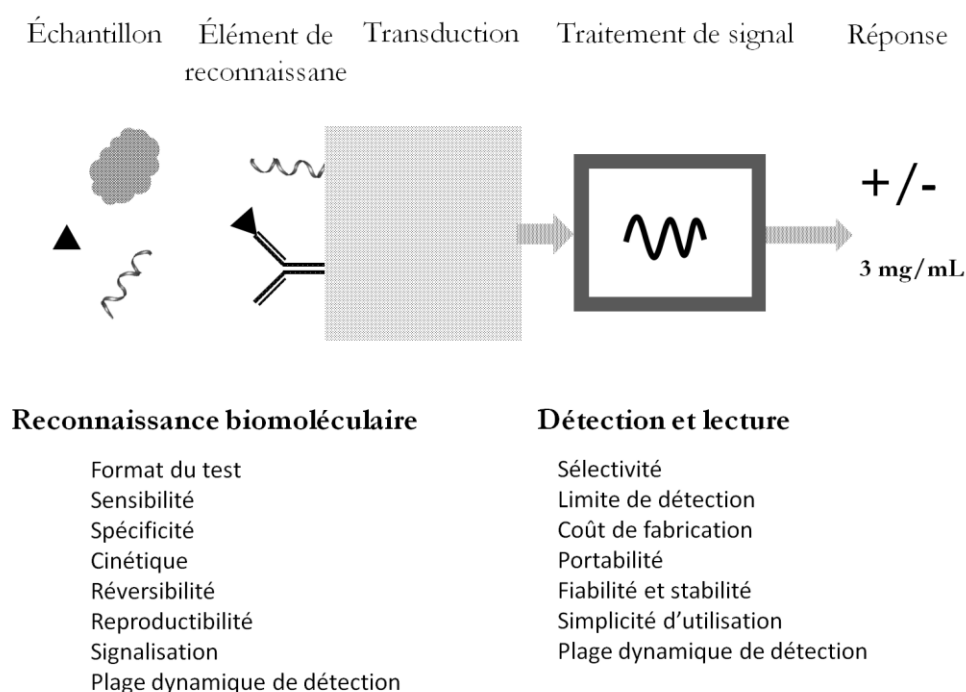


Figure 1.1 : Schématisation d'un biocapteur et considérations opérationnelles pour chaque sous-section.

Reconnaissance biomoléculaire

La première branche est la plus déterminante en ce qui a trait à la spécificité, à la sensibilité, à la cinétique et à la plage dynamique de détection du capteur [13]. L'élément de reconnaissance doit être choisi de façon à avoir une forte affinité, spécificité et stabilité avec le ligand recherché. Notons que "ligand" est utilisé ici selon sa définition en biologie, c'est-à-dire une molécule qui se lie de façon réversible à une macromolécule. L'élément de reconnaissance doit aussi être choisi de manière à produire un signal mesurable par le transducteur *uniquement* lors de la reconnaissance de la cible et pas lors d'interactions avec d'autres biomolécules [14]. Pour remplir tous ces critères, la plupart des biocapteurs qui connaissent un succès commercial - notamment le populaire senseur de glucose - utilisent une reconnaissance enzymatique. Le plus souvent, ils sont basés sur des enzymes de type oxydoréductase qui catalysent des réactions d'oxydation ou de réduction qui produisent ou consomment des espèces électro-actives dont la variation en concentration est corrélée à la présence du ligand [15]. Ainsi, l'événement de reconnaissance produit directement un signal mesurable qui peut difficilement être reproduit par d'autres réactions non-spécifiques dans l'échantillon.

Le principal inconvénient de la stratégie de reconnaissance enzymatique est qu'elle est limitée aux ligands pour lesquels il existe une enzyme oxydoréductase [16]. Aussi, elle peut difficilement être utilisée *in vivo* parce qu'elle modifie le contenu de l'échantillon et n'est pas régénérable. C'est pourquoi la majorité de la recherche est orientée vers des biocapteurs où la reconnaissance est basée sur l'affinité entre le récepteur et la biomolécule recherchée, ce qui ouvre la porte sur pratiquement tous les types de ligands [17]. Les récepteurs peuvent par exemple être des anticorps [18], des peptides [19], des protéines réceptrices, de l'ADN [20, 21] ou des matériaux biomimétiques. De plus, ce type de reconnaissance affecte peu la composition et les conditions du milieu et peut être utilisé plusieurs fois en dénaturant le complexe sonde/cible. Le principal désavantage est que, contrairement aux réactions enzymatiques, les événements de reconnaissance biomoléculaire par affinité ne produisent que rarement un signal caractéristique et mesurable, ce qui en complique la transduction.

Détection et lecture

La deuxième branche est la plus déterminante en ce qui a trait à la sélectivité, à la limite de détection, à la fiabilité, au coût et aux dimensions de l'instrument final [17]. Le mode de transduction doit être choisi de sorte à détecter l'événement de reconnaissance spécifique - et aucun autre. Pour une grande catégorie de biocapteurs appelés "sans marquage", la détection est basée sur une variation des propriétés physicochimiques **localisées** causées par la formation du complexe sonde-cible [14]. Les propriétés qui peuvent être modifiées sont, par exemple, la masse, l'indice de réfraction, la charge, la conductivité, la structure tridimensionnelle et l'absorption, et leurs variations sont sondées par le mode de transduction approprié. Par exemple, les biocapteurs électriques (*e.g.* impédimétrique [22]) sont sensibles à la charge ou à la conductivité; les biocapteurs mécaniques (*e.g.* micro-balances à quartz [23]) sont sensibles à la masse; les biocapteurs optiques (*e.g.* SPR [24], micro-cavités résonantes [25], plasmon de surface localisé [26]) sont sensibles à l'indice de réfraction ou à l'absorption.

1.2 Problématique

Pour développer des plateformes de bio-détection versatiles et régénérables, il est préférable d'utiliser la bio-reconnaissance basée sur l'affinité. Ce type de reconnaissance ne produit pas de signal caractéristique, c'est pourquoi la détection des événements de reconnaissance est basée sur les variations de propriétés physicochimiques. Cependant, les autres molécules présentes dans l'échantillon ont elles aussi des propriétés physicochimiques - une masse, une charge, un indice de réfraction. Par conséquent, *tout contaminant qui interagit non-spécifiquement avec le récepteur ou la surface de détection va influencer la mesure.*

La SPR est uniquement sensible aux variations d'indice de réfraction et ne peut pas différencier s'ils proviennent de la détection spécifique du ligand recherché ou de la détection non-spécifique de contaminants [27] (Figure 1.2). Ce problème de sélectivité devient particulièrement gênant pour faire la détection de faibles concentrations de petites biomolécules dans la grande soupe hétérogène que sont les échantillons biologiques: le sérum sanguin contient environ 70 mg/mL de protéines [28], tandis que les biomarqueurs d'intérêt y sont typiquement présents à des concentrations de pg/mL à µg/mL [12]. Il faut noter que ce problème n'est pas

unique au SPR: il est en effet l'un des principaux défis pour le développement de nouveaux outils de bio-diagnostique [29, 30].

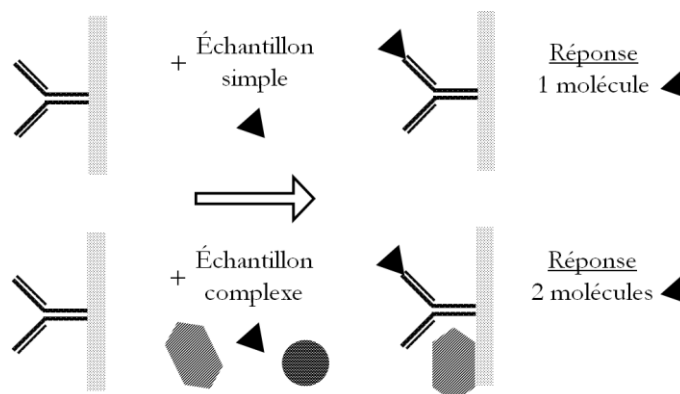


Figure 1.2 : Schématisation du problème de sélectivité des capteurs SPR.

Approches actuelles

Les quatre principales approches investiguées dans la littérature pour contrer les effets de l'adsorption non-spécifique sont résumées ici. Il faut noter que ces approches ne sont pas mutuellement exclusives et ont avantage à être utilisées de façon combinée [31].

Fonctionnalisation de surface optimisée

Le principe est de fonctionnaliser la surface de façon à bloquer les sites disponibles pour l'adsorption non-spécifique. Plusieurs types de fonctionnalisation ont montré de bonnes performances dans des milieux complexes, notamment à base de polymères (poly-carboxybétaine (pCB) [32, 33], polyethylene glycol (PEG) [34]), de peptides [35, 36] et de monocouches auto-assemblées [37].

Méthodes de référence

Cette approche consiste à comparer le signal mesuré dans le canal de test avec le signal obtenu dans un canal témoin [12]. Le canal témoin doit être fonctionnalisé de façon à ne pas reconnaître le ligand, mais doit subir la même adsorption non-spécifique que le canal de test. En soustrayant le signal obtenu dans les deux canaux, il est possible d'en extraire l'information sur l'accroche spécifique. D'autres méthodes de référence ont aussi été développées où la fonctionnalisation est la même sur les deux canaux [38].

Marquage

Le marquage consiste à faire la détection d'un marqueur qui est indicateur de la présence de la cible plutôt que de la cible elle-même. En SPR, le marqueur est typiquement une particule avec des propriétés optiques contrastantes, par exemples des nanoparticules d'or, d'argent ou d'oxyde de fer [39, 40]. La sélectivité de cette approche provient des propriétés caractéristiques du marqueur qui sont facilement mesurables par le transducteur et qui ne peuvent pas être reproduites par la plupart des contaminants. Dépendamment du format du test, l'ajout de réactifs ou des étapes de marquage additionnelles peuvent être nécessaires.

Filtration de l'échantillon

Cette approche consiste à filtrer les biomolécules d'intérêt du reste des contaminants de l'échantillon pour ensuite effectuer la détection dans cet échantillon purifié. Les méthodes de filtration sont le plus souvent basées sur une séparation par la taille, notamment avec une structure poreuse [41], une filtration à flux tangentiel [42] ou une séparation à flux continu [43, 44], mais d'autres approches ont été développées, par exemple faire la capture les biomarqueurs dans l'échantillon brut pour ensuite les relâcher dans une solution tampon [45]. Ces techniques sont efficaces, mais nécessitent pour la plupart un système de livraison micro-fluidique sophistiqué.

1.3 Solution proposée

Ce projet investigate une nouvelle approche de détection qui vise à augmenter la sélectivité des biocapteurs SPR dans les milieux complexes. La performance de cette approche est basée sur la combinaison originale d'un élément de reconnaissance biomoléculaire de type "interrupteur bio-électrochimique" et d'un mode de transduction électro-plasmonique (eSPR). Cette combinaison augmente fortement la sélectivité de la détection dans les milieux complexes de trois façons:

Élément de reconnaissance qui produit la signalisation

Les interrupteurs bio-électrochimiques sont des récepteurs d'ADN synthétique qui produisent un *signal caractéristique et mesurable* lors d'un événement de reconnaissance par affinité qui peut difficilement être reproduit par des contaminants présents dans l'échantillon. Ils

sont fonctionnalisés à une extrémité par un groupement thiol (qui leur permet de se greffer à une électrode d'or) et à l'autre extrémité par une molécule de bleu de méthylène (MB) (Figure 1.3).

Leur séquence est conçue de façon à ce qu'ils adoptent une conformation tige-boucle, ce qui amène la molécule MB près de l'électrode. Le MB est une molécule électro-active et sa proximité de la surface lui permet d'échanger des électrons avec l'électrode et d'être réduite et oxydée. En absence de la cible, l'interrupteur est dans sa conformation "ON" où un courant d'oxydo-réduction peut circuler. Cependant, lorsque le récepteur reconnaît sa cible spécifique, la boucle se déplie et le MB est amené loin de la surface. La molécule ne peut plus échanger d'électrons avec la surface et aucun courant d'oxydo-réduction n'est mesuré. L'interrupteur est dans sa conformation "OFF".

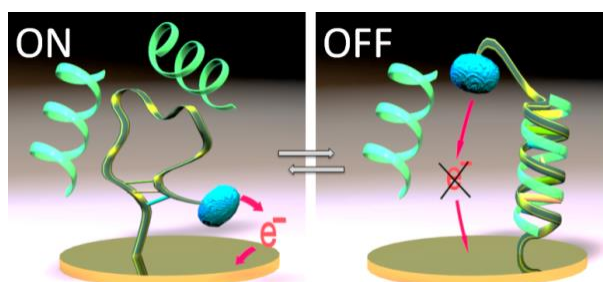


Figure 1.3 : Schéma de la signalisation des interrupteurs bio-électrochimiques, où le transfert d'électrons est possible dans la conformation "ON", mais impossible lorsque le récepteur adopte une conformation "OFF" suite à la reconnaissance de la cible.

Marquage optique modulable

En plus d'être une molécule électro-active, le *bleu de méthylène* (MB) est aussi un marqueur optique qui a des propriétés contrastées entre son état oxydé et réduit. En effet, elle montre un pic d'absorption dans les longueurs d'onde 600-680 nm dans son état oxydé, mais n'absorbe pas dans son état réduit (Figure 1.4). À 633 nm, il y a entre les deux états une différence de l'ordre de 10^{-2} unité d'indice de réfraction (RIU) à la fois dans la partie réelle et imaginaire de l'indice de réfraction (n et k). Par conséquent, l'oxydo-réduction des molécules de MB attachées aux interrupteurs bio-électrochimiques va également résulter en la modulation de leurs propriétés optiques. Cette technique produit en un signal optique modulé très caractéristique qui peut facilement être filtré du signal optique de fond. Cette approche de marquage est ainsi

plus puissante que les techniques conventionnelles en SPR qui utilisent des particules à haut indice de réfraction.

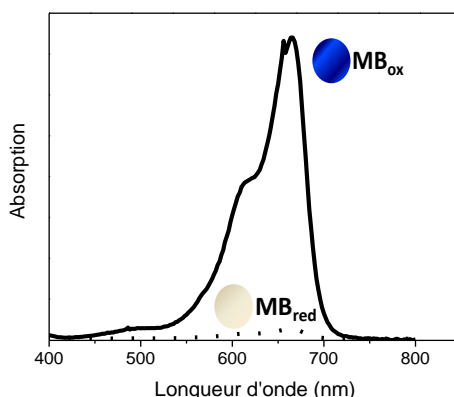


Figure 1.4 : Schéma de l'absorption du bleu de méthylène dans son état oxydé (MB_{ox} , ligne pleine) et dans son état réduit (MB_{red} , ligne pointillée).

Transduction électro-plasmonique

Pour faire la détection du signal optique modulé contrôlé par la conformation des interrupteurs bio-électrochimiques, le mode de transduction utilisé est une combinaison de l'électrochimie et de la plasmonique. Cette méthode consiste à utiliser la surface d'or sensible en SPR comme une électrode de travail dans une cellule électrochimique (Figure 1.5). La détection est obtenue en appliquant sur la surface un potentiel qui active l'oxydo-réduction du MB et en mesurant le signal plasmonique modulé résultant. L'amplitude de ce signal est indicateur de l'efficacité du transfert d'électrons et donc de la conformation de l'interrupteur. La force de ce mode de transduction est que le signal optique modulé est caractéristique du MB et peut difficilement être reproduit par des contaminants dans l'échantillon.

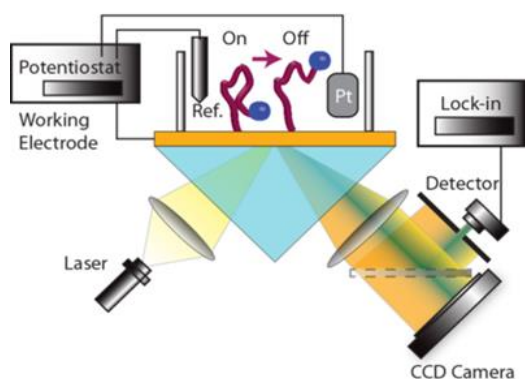


Figure 1.5 : Schéma d'un système de mesure basé sur une transduction électro-plasmonique.

1.4 Objectifs du projet de recherche

L'objectif à long terme est le développement d'un biocapteur portable, simple à utiliser, à faible coût, intégré et automatique basé sur la SPR qui ne nécessite pas de prétraitement des échantillons ni de personnel qualifié pour des applications sur-le-terrain. Ce projet de recherche est plus spécifiquement axé sur la résolution du problème de sélectivité dans les milieux complexes tels que des échantillons biologiques. Ainsi, **l'objectif principal est de développer une approche de détection à sélectivité accrue basée sur la SPR**. Pour ce faire, la stratégie proposée dans ce projet est la combinaison d'éléments de reconnaissance de type interrupteurs bio-électrochimiques avec une méthode de transduction électro-plasmonique.

En plus de l'objectif principal, il sera démontré que cette approche atteint deux autres sous-objectifs intéressants pour le développement de biocapteurs portables, soient que les échantillons produits pour la détection sont **régénérables** et peuvent ainsi être réutilisés, et que la détection peut aisément être **multiplexée** grâce aux propriétés de la méthode de transduction électro-plasmonique.

1.5 Plan du mémoire

Ce mémoire par article est divisé en trois chapitres. Le premier chapitre introduit les concepts théoriques des interrupteurs bio-électrochimiques, des méthodes de mesure électrochimiques et de la transduction plasmonique et électro-plasmonique. Un survol de la

littérature qui souligne les applications et avantages pour la bio-détection des méthodes choisies y est également inclus.

Le deuxième chapitre est la transcription de l'article intitulé "Electrochemical plasmonic sensing system for highly selective multiplexed detection of biomolecules based on redox nanoswitches", par Anne-Marie Dallaire, Sergiy Patskovsky, Alexis Vallée-Bélisle et Michel Meunier, accepté dans le journal *Biosensors and Bioelectronics* (Ref: BIOS-D-15-00361). Ce chapitre est le corps du mémoire et présente les principaux résultats qui démontrent l'atteinte des objectifs.

Dans le troisième chapitre, des résultats complémentaires à ceux présentés dans l'article sont montrés. Les qualités et faiblesses de l'approche développée sont discutées plus en profondeur, notamment en ce qui a trait à la sensibilité à l'indice de réfraction, à l'angle d'incidence et à la force ionique, et du traitement du bruit et de la dérive du signal.

CHAPITRE 2 THÉORIE ET REVUE DE LITTÉRATURE

Ce chapitre présente les concepts et bases théoriques nécessaires à la compréhension du principe de fonctionnement du biocapteur à sélectivité accrue développé dans ce projet. La première section traite des interrupteurs bio-électrochimiques et introduit leurs propriétés qui en font des éléments de reconnaissance et de signalisation puissants pour la bio-détection. Les notions théoriques de base de l'électrochimie utilisées pour l'analyse des données seront également couvertes. La deuxième section traite du moyen de transduction plasmonique choisi pour sonder les événements de reconnaissance biomoléculaire. Les paramètres sensibles du capteur SPR sont dérivés à partir des équations de Maxwell. Le mécanisme de détection des interrupteurs bio-électrochimiques par une transduction électro-plasmonique est introduit et les avantages d'un tel capteur sont expliqués.

2.1 Bio-détection basée sur des interrupteurs bio-électrochimiques

Dans cette section, les applications et les avantages des E-ADN pour la bio-détection sont discutés. Des aspects techniques importants pour l'interprétation des résultats - le procédé de fabrication, les méthodes de mesure électrochimiques - sont également abordés.

2.1.1 Survol

Les interrupteurs bio-électrochimiques (aussi abrégé dans ce mémoire par E-ADN pour *ADN électrochimique*, ou nanoswitchs en anglais) font partie d'une catégorie de capteurs dont la signalisation est produite par un transfert d'énergie ou d'électrons qui dépend de la distance entre un élément donneur et un élément accepteur. Cette méthode de signalisation devient particulièrement efficace lorsqu'elle est conjuguée à un événement de reconnaissance biomoléculaire qui engendre un changement de conformation dans la sonde [46]. En effet, les phénomènes de transfert d'énergie sont sensibles à des distances qui sont de l'ordre de grandeur des changements de conformations biomoléculaires, de 1 à 10 nm. Dans le cas de du transfert d'électrons par effet tunnel, la dépendance est en exponentielle décroissante e^{-d} , et dans le cas du transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET), la dépendance est d^{-6} .

Les E-ADN ont été proposés pour la première fois en 2003 par Fan, Plaxco et Heeger [47]. Ils ont été décrits comme une adaptation des très populaires balises moléculaires fluorescentes (*molecular beacons*) [48] sur une plateforme électrochimique. Dans les deux cas, le récepteur est conçu de façon à adopter une structure tige-boucle en absence de la cible, ce qui apporte les deux reporteurs près l'un de l'autre, où il peut y avoir un transfert d'énergie. Lorsque la cible est reconnue, la tige-boucle se déplie et éloigne les deux reporteurs, et le transfert n'est plus possible. Pour les balises moléculaires, les deux reporteurs sont une molécule fluorescente et un atténuateur, et le transfert d'énergie dépendant de la distance est un phénomène FRET (Figure 2.1 a). Pour les E-ADN, les deux reporteurs sont plutôt un marqueur électro-actif et une électrode, et le transfert d'énergie dépendant de la distance est un transfert d'électrons par effet tunnel (Figure 2.1 b).

Ainsi, la principale différence avec les balises moléculaires est que la transduction est électrochimique. Ceci représente un avantage d'abord en termes d'instrumentation, qui est plus compacte et abordable que l'instrumentation optique, mais aussi en termes de signalisation et de sélectivité, parce que les reporteurs rédox sont généralement plus robustes que les reporteurs fluorescents sensibles au photo-blanchiment [49] et parce qu'il existe très peu de contaminants dans les échantillons biologiques qui sont électro-actifs aux mêmes potentiels que le marqueur [50].

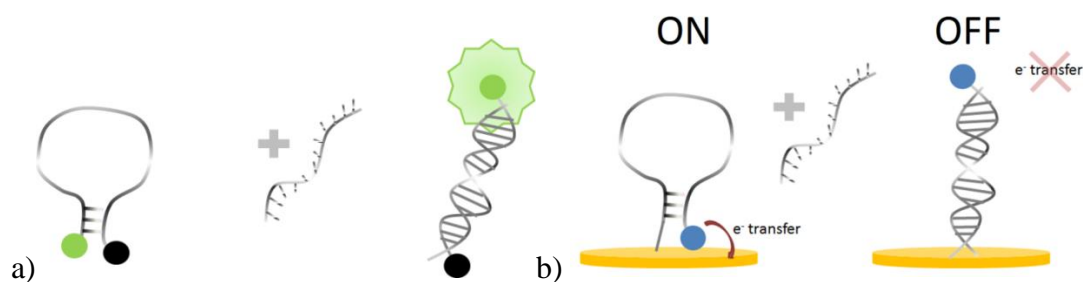


Figure 2.1 : a) Balises moléculaires fluorescentes. b) Interrupteurs bio-électrochimiques.

2.1.2 Exemples d'application en bio-détection

Les E-ADN utilisent toujours des éléments de reconnaissance biomoléculaire basés sur l'ADN. Celle-ci a l'avantage d'être simplement synthétisée, d'être stable et de pouvoir adopter des configurations qui lui permettent de reconnaître différents types de ligands: en effet, l'ADN n'est

pas limité à la reconnaissance de cibles d'ADN. Les dernières années ont vu la montée fulgurante d'éléments de reconnaissance de type aptamère, qui sont des segments d'ADN et d'ARN synthétiques dont la séquence est optimisée *in vitro* pour reconnaître et capturer spécifiquement une biomolécule cible [51]. En intégrant la séquence d'un aptamère dans le récepteur E-ADN, il devient possible de reconnaître le ligand cible qui peut être une protéine, un anticorps, une biomolécule, etc. La séquence d'ADN du récepteur doit cependant toujours être adaptée de façon à non seulement reconnaître sa cible, mais aussi à subir un changement de conformation important lors de la bio-reconnaissance qui modifiera de façon significative la distance entre le reporteur et la surface. Quelques exemples de la littérature sont présentés ici.

Détection d'ADN

La bio-reconnaissance d'ADN est basée sur l'affinité des deux paires d'acides nucléiques adénine-thymine et guanine-cytosine, communément appelées les paires de Watson-Crick, qui forment des ponts hydrogène spécifiques. Dans l'architecture de type tige-boucle montré à la Figure 2.1 (b), le récepteur E-ADN est conçu de façon à contenir la séquence de nucléotides complémentaire à la cible dans la boucle. À chaque extrémité du récepteur, 3 à 5 paires de bases complémentaires entre-elles sont ajoutées de façon à assurer que la boucle soit solidement refermée en absence de la cible [47, 52]. Le dépliement de la boucle nécessite un apport d'énergie significatif qui peut être fourni par l'attache d'un oligonucléotide cible fortement complémentaire. D'autres architectures ont été conçues de façon à améliorer l'efficacité de la signalisation (*ex.* signal OFF→ON plutôt que ON→OFF), la limite de détection, la plage de détection et la spécificité du capteur [53]. Les conceptions ont été optimisées jusqu'à pouvoir discriminer une seule paire de bases non-agencée [54].

Détection de protéines et d'anticorps

La reconnaissance par aptamère permet la détection par interrupteurs bio-électrochimiques de protéines telles que la thrombine [55] et de facteurs de croissance [56]. D'autres stratégies pour la détection d'anticorps est l'ajout d'antigènes dans la structure de l'interrupteur sur lesquels l'anticorps peut se lier, forçant ainsi le dépliement du récepteur d'oligonucléotide [57].

Détection de molécules, de métaux et d'ions

Des récepteurs de type aptamère ont été adaptés pour la détection de molécules d'ATP [58], d'ions potassium [59] et de cocaïne [60]. Des récepteurs sont basés sur l'ARN plutôt que l'ADN ont été utilisés pour reconnaître des antibiotiques de type aminoglycosides [61] et la théophylline [62]. Un design d'interrupteurs bio-électrochimiques à double brins dont la séquence est basée sur une enzyme ADN (DNAzyme) a été adapté pour la détection d'ions métalliques de plomb [50]. En présence de plomb à des concentrations aussi faibles qu'une partie par milliard, l'enzyme ADN clive un oligonucléotide, ce qui relâche la structure et permet au reporteur rédox de s'approcher de la surface.

2.1.3 Procédé de fabrication

Le procédé de fabrication des biocapteurs basés sur les E-ADN a été standardisé par le groupe du professeur Plaxco de l'Université de Californie à Santa Barbara [63]. Les biocapteurs sont typiquement préparés sur des micro-disques d'or achetés commercialement qui sont régénérés avant chaque utilisation. Ce procédé implique de polir les électrodes avec une poudre d'alumine de 50 nm, de les immerger dans un bain sonore pendant 5 minutes pour éliminer les résidus de poudre, et de nettoyer électrochimiquement la surface dans des solutions de 0.5 M d'acide sulfurique et de 0.01 M KCl + 0.1 M d'acide sulfurique [64]. En pratique, ils peuvent être adaptés à différents types d'électrodes, par exemple des électrodes d'or sérigraphiées [65], à condition que la géométrie soit optimisée pour maximiser la réponse. Les principales étapes de fonctionnalisation sont les suivantes:

1- Préparer 1 mL une solution de 10 mM de tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) dans de l'eau déionisée. Combiner 1 μ L d'une solution de 200 μ M du récepteur avec 2 μ L de la solution de TCEP et incubé à 4°C pendant 1 heure. Le TCEP est utilisé pour réduire les ponts disulfures qui se sont formés entre les groupements thiol des sondes.

2- Après incubation, dissoudre la solution préparée à l'étape 1 à un volume de 1 mL dans un tampon phosphate salin (PBS) pH 7.2, pour une concentration finale de 200 nM de sondes. Mettre 200 μ L de la solution de sondes dans un *epENDORF* de 2 mL et y submerger l'électrode nettoyée. Incuber pour une heure à température pièce. Les groupements thiol des sondes vont

s'attacher de façon covalente à l'électrode d'or, immobilisant les interrupteurs à la surface. Rincer l'électrode avec de l'eau déionisée.

3- Préparer une solution de 2 mL de 2 mM 6-mercaptop-1-hexanol (MCH) dans un deuxième *eppendorf*. Immerger l'électrode dans la solution de MCH et incuber à 4°C pour une durée allant de 3 à 16 heures. Le MCH est utilisé ici comme thiol diluant qui vient combler les sites libres sur l'électrode qui n'ont pas été fonctionnalisés par des interrupteurs [37]. Rincer l'électrode avec de l'eau déionisée, la stabiliser dans une solution tampon et mesurer les voltammogrammes initiaux. L'électrode est maintenant prête pour le test.

4- Préparer 1 mL de l'échantillon à tester contenant la cible. Y submerger l'électrode pour une durée de 10-30 minutes et mesurer les propriétés finales.

Un schéma des principales étapes de fonctionnalisation est présentée à la Figure 2.2.

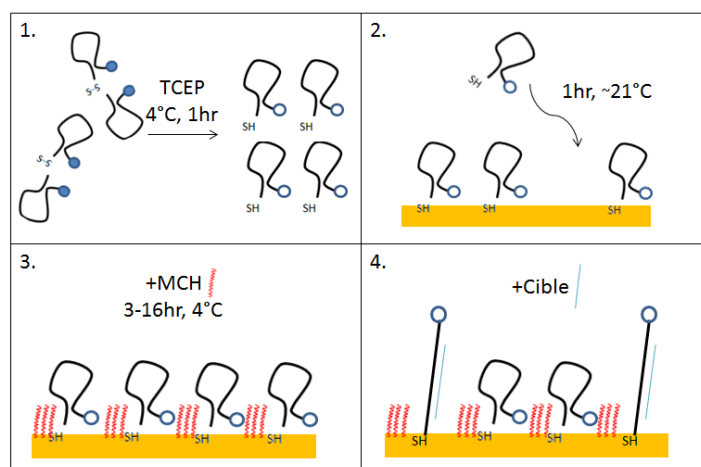


Figure 2.2 : Schéma du protocole de fonctionnalisation des interrupteurs bio-électrochimiques sur une électrode d'or.

2.1.4 Bases théoriques de l'électrochimie des interrupteurs bio-électrochimiques

Dans le cadre de ce travail, uniquement les aspects de l'électrochimie qui sont pertinents pour l'analyse du comportement des interrupteurs bio-électrochimiques seront traités. En effet, ceux-ci représentent un cas simplifié où l'électrode de travail est passivée et où les espèces électro-actives à détecter sont immobilisées à sa surface. Dans cette situation, les effets de la

capacité double-couche sont contrôlés et la diffusion des espèces électro-actives ne doit pas être considérée [66]. Cette section va traiter des phénomènes électrochimiques et de l'instrumentation, des propriétés d'oxydo-réduction des E-ADN et finalement des méthodes utilisées pour sonder leur conformation.

Phénomènes électrochimiques et système de mesure

Pour qu'un courant puisse circuler entre un métal conducteur et une solution électrolytique, il doit y avoir une transition entre les modes de conduction électronique et ionique. À l'interface entre les deux phases, un transfert de charge doit avoir lieu entre les électrons libres du métal et les électrolytes en solution. L'électrochimie étudie les phénomènes électriques et chimiques en jeu dans le transfert de charge à l'interface entre une électrode métallique et une solution électrolytique [67]. La cellule électrochimique est le dispositif qui est utilisé pour sonder les phénomènes électrochimiques à l'interface. Elle est typiquement composée de trois électrodes: l'électrode de travail (WE pour *Working Electrode*), la contre-électrode (C-E) et l'électrode de référence (REF) (Figure 2.3).

L'électrode de travail WE est celle qui supporte les réactions de transfert d'électrons et sur laquelle le potentiel est appliqué. Pour en assurer la stabilité, elle est généralement composée d'un métal qui subit peu d'oxydation aux potentiels sondés (ex. or, platine, iridium). L'électrode de référence REF est une électrode dont le potentiel est maintenu à une valeur constante. Elle est composée d'un couple d'oxydo-réduction saturé qui a un potentiel standard fixe (ex: Ag/AgCl). Elle sert à contrôler et stabiliser le potentiel appliqué sur l'électrode de travail et seulement un très faible courant y circule. Finalement, la contre-électrode C-E sert à fermer le circuit électrique avec l'électrode de travail et permet la circulation du courant. Elle est composée de platine et a une aire plus grande que l'électrode de travail pour assurer que le courant qui circule n'est pas limité par la réaction à la contre-électrode. S'il est possible d'utiliser une seule électrode qui effectue à la fois le travail de la C-E et de la REF, il est préférable de les séparer de façon à ce que le courant qui circule ne déstabilise pas le potentiel de la référence. Le potentiostat est l'instrument qui peut simultanément contrôler le potentiel V appliqué entre WE et REF et mesurer le courant A qui circule entre WE et C-E (Figure 2.3).

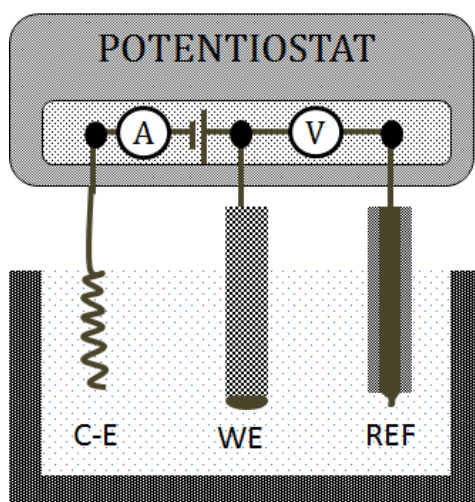


Figure 2.3 : Configuration typique d'une cellule électrochimique comprenant une électrode de travail (WE), une électrode de référence (REF) et une contre-électrode (C-E) et le circuit équivalent du système de mesure .

La relation entre le courant mesuré et le potentiel appliqué peut être faite en traitant la cellule électrochimique comme un circuit équivalent avec une impédance $Z(f, E_{app})$, où f est la fréquence du potentiel AC appliqué et E_{app} est la composante DC du potentiel appliqué. Pour être en mesure de faire une modélisation adéquate du circuit équivalent d'un système tel que celui des interrupteurs bio-électrochimiques, il faut d'abord en connaître les principales propriétés électrochimiques.

Propriétés d'oxydo-réduction du marqueur bleu de méthylène

Le bleu de méthylène (MB) est un composé organique largement utilisé comme indicateur rédox en raison de ses propriétés électrochimiques. Ce composé comporte une forme oxydée, nommée bleu de méthylène (MB_{ox}), et une forme réduite, le bleu de leucométhylène (MB_{red}). La réaction d'oxydation de ce composé est un processus à deux électrons et nécessite l'ajout d'un proton hydrogène H^+ (Figure 2.4). Le potentiel de réduction E_o du MB adsorbé à la surface est d'environ -275 mV vs. Ag/AgCl.

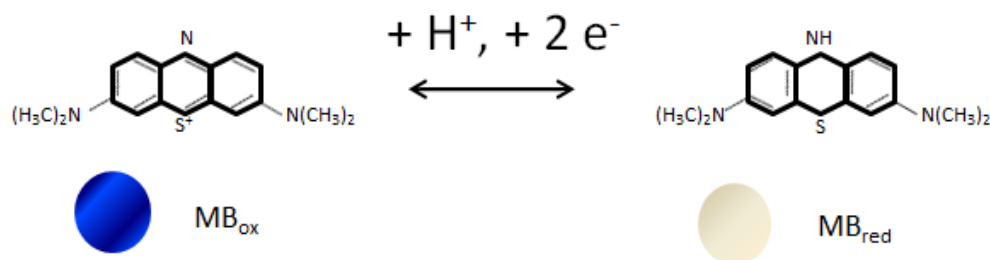


Figure 2.4 : Réaction d'oxydoréduction entre l'état oxydé et réduit du marqueur rédox bleu de méthylène.

L'oxydation et la réduction du MB ont lieu lorsque les électrons sont fournis (réduction) ou acceptés (oxydation) par l'électrode de travail. L'efficacité de ce processus de transfert d'électrons dépend de plusieurs facteurs. Dans le cas des E-ADN, le taux de transfert d'électron peut être limité par deux phénomènes [68]. Dans la configuration ON où le MB est fixé à proximité de l'électrode, la vitesse est limitée par le taux de transfert d'électrons k_{et} entre le MB et l'électrode à travers la monocouche de thiols diluants MCH. Dans la configuration OFF, la structure d'ADN en double-brins est rigide et maintient le MB loin de la surface, où le transfert d'électrons est impossible. La vitesse du transfert d'électrons est maintenant limitée par la vitesse d'approche k_1 du MB vers la surface, qui est déterminée par la flexibilité du complexe récepteur/cible (Figure 2.5).

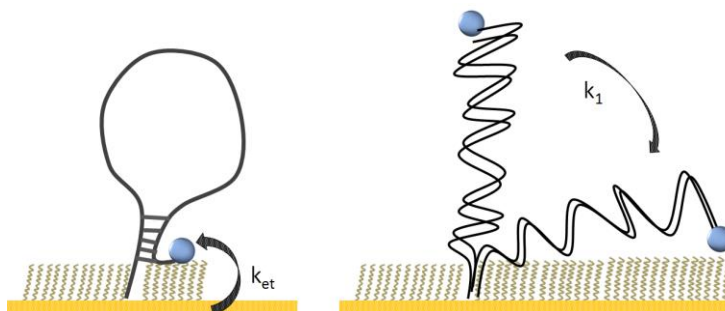


Figure 2.5 : Les deux mécanismes limitant du transfert d'électrons dans les interrupteurs bio-électrochimiques: limité par le k_{et} à travers la monocouche dans la configuration ON, limité par le taux d'approche à l'électrode k_1 dans la configuration OFF.

Analysons qualitativement les paramètres qui influencent le taux de transfert d'électrons à travers la monocouche k_{et} . Il a été montré que le transfert d'électrons à travers une monocouche d'alcane (tel que le MCH) est un processus par effet tunnel [69] qui est généralement modélisé

par un complexe donneur-pont-accepteur (D-B-A), où l'électron est transféré du donneur à l'accepteur à travers le pont. Selon le modèle de Marcus, le taux de transfert d'électrons par effet tunnel peut être exprimé de façon analytique comme [69, 70]:

$$k_{tun} = \frac{2\pi H_{DA}^2}{h} \left(\frac{\pi}{\lambda k_B T} \right)^{\frac{1}{2}} \exp \left(-\frac{(\lambda + \Delta G^\circ)^2}{4\lambda k_B T} \right) \exp(-\beta_{BD} d_{DA}) \quad (2.1)$$

où H_{DA} est le couplage électronique entre les sites donneur et accepteur, λ est l'énergie de réorganisation, h est la constante de Planck, k_B est la constante de Boltzmann, ΔG° est la variation d'énergie de Gibbs pour le transfert d'électrons, T est la température, β_{BD} est un terme de couplage relié au pont (0.9-1.3 Å⁻¹ pour le MCH [69]) et d_{DA} est la distance entre le donneur et l'accepteur.

Un dernier aspect à considérer est que l'accepteur est une électrode qui possède plusieurs niveaux d'énergie ϵ . Le taux de transfert d'électron peut être calculé en intégrant les niveaux d'énergie du donneur et de l'accepteur par rapport à ϵ [66]:

$$k_{ox} = A \rho_m(E_F) \int_{-\infty}^{\infty} \exp \left(-\frac{(\lambda - \epsilon + e_0 \eta)^2}{4\lambda k_B T} \right) [H_{DA}(\epsilon)]^2 \frac{1}{1 + \exp \left[\frac{\epsilon}{k_B T} \right]} d\epsilon \quad (2.2)$$

où A est un facteur pré-exponentiel, $\rho_m(E_F)$ est la densité d'états électroniques près du niveau de Fermi, η est la surtension, qui est la différence entre le potentiel appliqué et le potentiel rédox ($E_{app} - E_o$). La dernière expression est la distribution de Fermi-Dirac qui donne l'occupation de chaque niveau d'énergie à une température donnée.

En somme, le taux de transfert d'électrons k_{et} dépend de la température, de la nature du thiol diluant, de la distance entre le MB et l'électrode et de l'énergie nécessaire pour réorganiser les atomes et les molécules du solvant après le transfert d'électrons. Le k_{et} va également aborder une forme gaussienne en fonction de la surtension η .

Circuit équivalent

Le circuit équivalent de la cellule électrochimique des E-ADN dépend fortement du potentiel DC appliqué E_{app} [68]. En effet, si ce potentiel est loin du potentiel de réduction E_o du bleu de méthylène, il n'y aura pas de transfert d'électrons causé par l'oxydo-réduction du MB. Le circuit équivalent est alors approximé par le circuit à trois composantes de la Figure 2.6 (a).

- R_{sol} est la résistance de la solution électrolytique et dépend de la géométrie de la cellule et de la concentration d'ions qu'elle contient. Plus il y a d'ions, plus la conduction est facile est plus R_{sol} est petite.

- C_{DL} est la capacité double-couche. Celle-ci provient de l'organisation en structure double-couche des ions à proximité de l'électrode lorsqu'un potentiel y est appliqué. Sa valeur dépend de la concentration ionique, de l'aire de l'électrode et de la distance entre les ions et la surface [67]. Lorsque la surface est modifiée par une monocouche auto-assemblée, par exemple de MCH, la distance entre les ions et la surface est augmentée et la capacité double-couche diminue.

- R_{ct} est la résistance au transfert de charge et est reliée au taux de transfert d'électrons. C'est une mesure de la difficulté à transmettre des électrons de la solution électrolytique à l'électrode.

Lorsque le potentiel appliqué est égal ou près du potentiel de réduction du MB, le circuit équivalent doit être adapté pour prendre en considération les phénomènes d'oxydo-réduction. R_{sol} et C_{DL} restent constants, car ces paramètres ne sont pas affectés par l'oxydo-réduction. Cependant, R_{ct} diminue parce que les électrons peuvent traverser facilement l'interface solide-liquide par une réaction d'oxydation ou réduction du bleu de méthylène [66]. Aussi, une nouvelle composante apparaît:

- C_{ads} est le pseudo-condensateur adsorbé associé à la monocouche de bleu de méthylène fixée près de la surface. En effet, le transfert d'électrons amène les MB à pouvoir accumuler des charges à proximité de la surface, ce qui agit comme un condensateur. Lorsque les MB sont éloignés de la surface, la distance entre les charges et la surface augmente et la capacité diminue.

Notons que la conformation des interrupteurs va affecter l'efficacité du transfert d'électrons. Par conséquent, dans la conformation ON, le transfert d'électron est rapide, R_{ct} est petite et C_{ads} est grande. Au contraire, dans la conformation OFF, le transfert d'électron est lent, R_{ct} est grande et C_{ads} est petite.

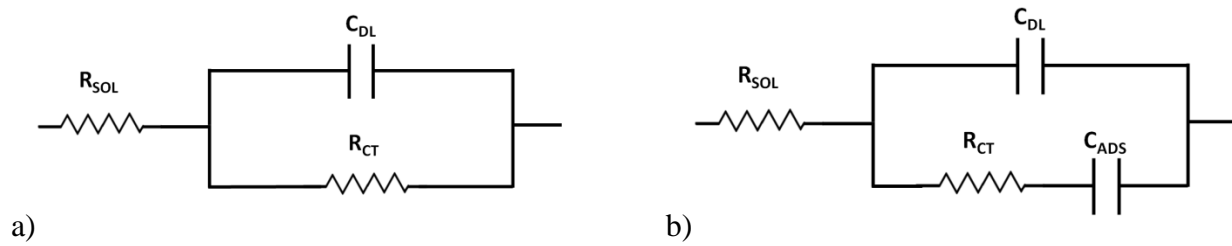


Figure 2.6 : Circuits équivalents de la cellule électrochimique des interrupteurs bio-électrochimiques à a) $E_{app} \neq E_0$ et b) à $E_{app} = E_0$.

Méthodes électrochimiques

Les méthodes électrochimiques consistent à appliquer une perturbation électrique (variable indépendante) sur le système et d'enregistrer le signal de réponse (variable dépendante) pour sonder les propriétés d'intérêt de la cellule de mesure [71]. Dans le cas des E-ADN, il a été établi que la propriété la plus intéressante est le taux de transfert d'électron k_{et} . Deux méthodes électrochimiques seront utilisées dans ce travail pour le sonder.

Voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie cyclique est l'une des méthodes électrochimiques les plus répandues pour l'analyse d'espèces électro-actives en raison de sa simplicité expérimentale et d'analyse. Elle est définie comme la mesure du courant I générée par le balayage cyclique d'un potentiel V sur l'électrode de travail immergée dans un liquide électrolytique sans agitation [67]. Le potentiel appliqué en fonction du temps prend la forme montrée sur la Figure 2.7 (a), où le potentiel est balayé dans le sens positif d'une valeur V_{min} jusqu'à V_{max} avec un taux v (V/s), ensuite dans le sens négatif avec un taux $-v$. Les résultats sont typiquement présentés sous la forme d'un voltammogramme du courant en fonction du potentiel tel que montré à la Figure 2.7 (b).

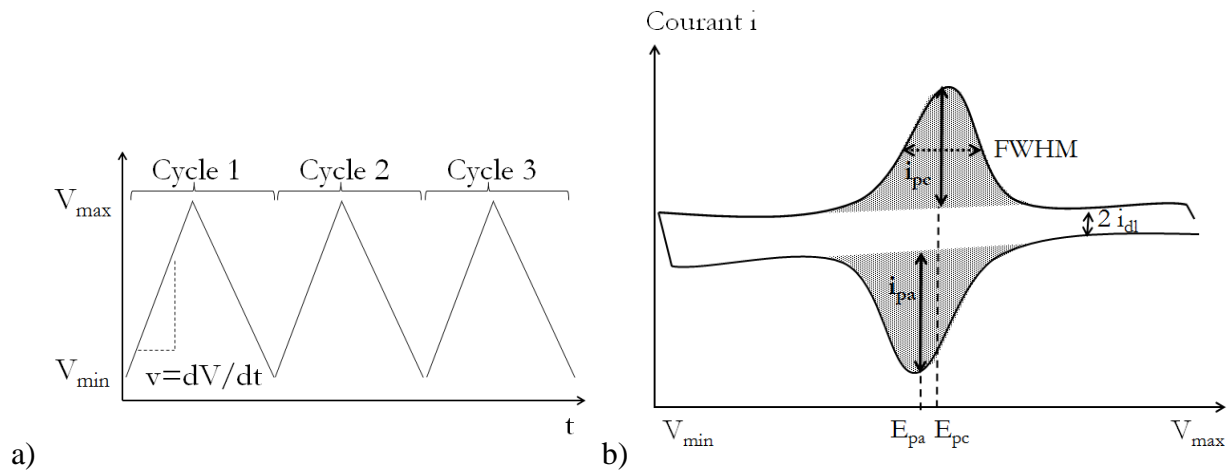


Figure 2.7 : a) Potentiel appliqué en fonction du temps en voltampérométrie cyclique. b) Voltammogramme typique pour une monocouche autoassemblée rédox.

Le courant montre une valeur de base associée au courant de charge de la capacité double-couche C_{dl} (i_{dl}) qui dépend du taux de balayage du potentiel v :

$$i_{dl} = C_{dl}v \quad (2.3)$$

Les courants d'oxydation (i_{pa}) et de réduction (i_{pc}) sont eux aussi proportionnels au taux de balayage v selon la formule:

$$i_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A_{sur} \Gamma \quad (2.4)$$

où n est le nombre d'électrons échangés dans la réaction, F est la constante de Faraday, R est la constante des gaz parfaits, A_{sur} est l'aire de l'électrode de travail, et Γ est le recouvrement de la surface (en molécules électro-actives/cm²). Le potentiel d'oxydo-réduction est la moyenne des potentiels anodiques et cathodiques:

$$E_0 = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (2.5)$$

L'aire sous le pic cathodique (région ombrée dans la Figure 2.7 b) est reliée à la charge totale Q qui a été échangée dans la réaction. En divisant Q par la surface de l'électrode A_{sur} et par le nombre d'électrons échangés par réaction n , la valeur estimée de le recouvrement Γ est obtenue [72]:

$$\Gamma = \frac{Q}{A_{sur}n} \quad (2.6)$$

Le voltammogramme typique pour une surface fonctionnalisée avec des interrupteurs bio-électrochimiques est montré à la Figure 2.8. Au début du scan (a), tous les MB sont à l'état oxydé et le courant a une amplitude constante liée à R_{sol} et C_{dl} . Le potentiel est graduellement diminué et, au point (b), il atteint le potentiel de réduction. L'électrode peut alors donner des électrons au MB, résultant en une augmentation du courant mesuré. Éventuellement, tous les MB sont réduits et le courant retourne à son amplitude de base (c). Au point (d), le sens du balayage est renversé vers les valeurs positives. Au point (e), il atteint le potentiel d'oxydation et les MB donnent des électrons à l'électrode, résultant en un pic de courant en sens inverse. Lorsque tous les MB sont oxydés, le courant retourne à sa valeur de base (f). Notons que le pic adopte une forme gaussienne autour du potentiel de rédox, tel que prédit par la dépendance entre k_{et} et η à l'équation 2.2.

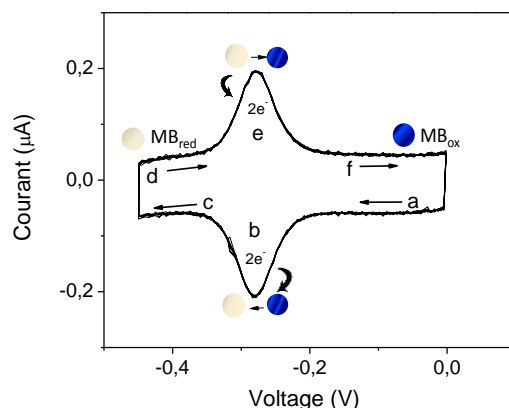


Figure 2.8 : Voltammogramme cyclique pour un échantillon modifié avec des interrupteurs bio-électrochimiques contenant un reporteur bleu de méthylène.

Voltampérométrie à courant alternatif

Cette méthode consiste à balayer un potentiel DC d'une valeur V_{max} à V_{min} et d'y surimposer une faible perturbation AC de fréquence f_{ac} et d'amplitude V_{ac} (Figure 2.9 a). La variable mesurée est l'amplitude du courant alternatif $I_{AC\ amp}$ en fonction du potentiel DC appliqué (Figure 2.9 b).

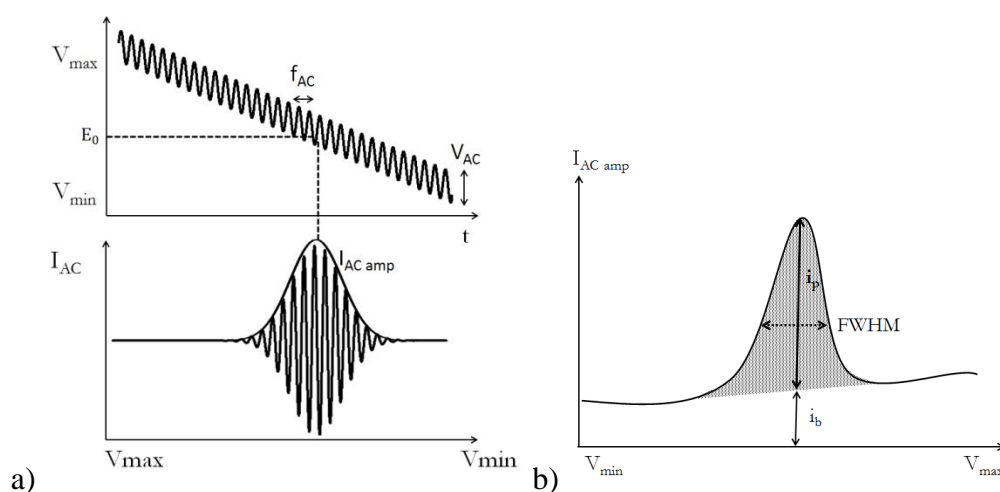


Figure 2.9 : a) Haut: Potentiel appliqué en fonction du temps en voltampérométrie à courant alternatif. Bas: Courant alternatif résultant de l'application du potentiel alternatif, avec un pic d'amplitude au potentiel rédox E_0 . b) Voltammogramme à courant alternatif typique pour une surface modifiée avec des E-ADN.

Le voltammogramme mesuré montre un pic d'amplitude i_p correspondant aux phénomènes d'oxydo-réduction, et une valeur de base i_b associée principalement à la C_{dl} et R_{sol} . Creager et Wooster ont démontré que le taux de transfert d'électrons dans le cas d'espèces électro-actives adsorbées à l'électrode peut être calculé à partir du ratio entre le courant pic et le courant de base à différentes fréquences f_{ac} [73].

Un exemple de ce traitement est montré à la Figure 2.10. Chaque courbe montre deux plateaux. À basses fréquences, le ratio i_p/i_b est principalement limité par le ratio entre les capacités $(C_{ads} + C_{dl})/C_{dl}$ [73]. Ainsi, dans la conformation "ON", C_{ads} est grande et le ratio est élevé, tandis que dans la conformation "OFF", C_{ads} est petite et le ratio est faible. À plus hautes fréquences, les variations de potentiel deviennent trop rapides pour que le transfert d'électron puisse se faire, et le ratio i_p/i_b tend vers 1 (*i.e.* il n'y a plus de phénomènes d'oxydo-réduction). Ainsi, la fréquence à partir de laquelle le ratio tend vers 1 est approximativement égale au taux de transfert d'électrons. Dans le cas d'un interrupteur en configuration "ON", le taux limité par k_{et} est rapide et la fréquence est élevée (dans cet exemple ~ 500 Hz). En configuration "OFF", le taux limité par k_1 est lent et la fréquence est basse (~ 10 Hz). Ainsi, en se fixant à une f_{ac} plus petite

que le taux de transfert de l'état "ON", il est possible de sonder la conformation en mesurant le pic i_p [74].

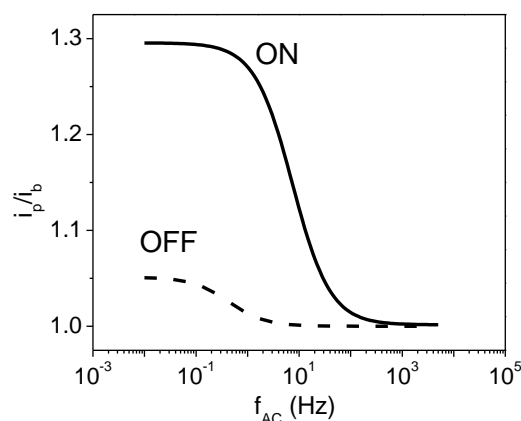


Figure 2.10: Schéma du ratio i_p/i_b en fonction de la fréquence pour des interrupteurs en configuration ON (sans cible) et OFF (avec cible).

2.1.5 Avantages des biocapteurs basés sur les interrupteurs bio-électrochimiques

Les E-ADN sont utilisés ici à la fois comme éléments de reconnaissance biomoléculaire par affinité et comme éléments de signalisation basés sur la distance entre un reporteur électrochimique et une électrode. Ces deux caractéristiques leur confèrent les avantages suivants:

i) **Versatiles:** Les éléments de bio-reconnaissance à base d'ADN utilisés ont démontré leur efficacité dans la détection de divers types de cibles, notamment d'ADN, d'anticorps, de protéines, d'ions métalliques et de molécules organiques.

ii) **Stables:** Les électrodes d'or fonctionnalisées avec les interrupteurs peuvent être conservées à l'état sec pour plus d'un mois [75]. Si leurs performances sont affectées en fonction de la température, du pH et de la concentration ionique auxquels les tests sont effectués, ils ne sont pas facilement dénaturés par ces facteurs. Le signal du marqueur bleu de méthylène est relativement stable dans le temps (dégradation de 38% après 180h dans une solution tampon) [76].

iii) **Réutilisables:** Après un test de bio-affinité, la surface peut être régénérée avec un rinçage à l'eau déionisée, au chlorure de guanidine 8 M [54] ou à l'urée 8 M, permettant de faire plus de quinze différents tests de reconnaissance sur un même échantillon [76].

iv) **Sélectif:** Ces capteurs utilisent la signalisation électrochimique produite par le transfert d'électron entre un marqueur rédox et une électrode. Le succès de ces capteurs dans des échantillons à composition complexe est attribuable à la signalisation dépendante de la distance entre le marqueur rédox et l'électrode, qui est surtout modifiée par l'attache de la cible et est peu affectée par des interactions non-spécifiques. Le courant rédox observé est également caractéristique du marqueur et les contaminants électro-actifs qui pourraient reproduire ce signal sont très rares dans les échantillons biologiques [58]. Leur fonctionnement a été démontré dans le sérum sanguin [62], la salive [60], l'urine, la bière et de la terre [54] avec un très faible impact sur la réponse mesurée.

v) **Sans ajout de réactifs:** Le marquage de ces capteurs est contenu dans le récepteur biomoléculaire, et il n'est donc pas besoin de recourir à un protocole de test à plusieurs étapes pour marquer l'échantillon. La cible peut être directement détectée en ajoutant l'échantillon sur la surface du capteur [47].

vi) **Instrumentation:** Les plateformes de détection électrochimiques nécessitent une instrumentation qui est abordable, légère, portable et à faible consommation de puissance [46].

2.2 Bio-détection basée sur la SPR électrochimique

Cette section traite des bases théoriques de la transduction SPR électrochimique (eSPR) développée dans ce projet. La première partie introduit le formalisme de la SPR conventionnelle à partir des équations de Maxwell et retrouve les paramètres sensibles de ce transducteur pour la bio-détection. La deuxième partie couvre la eSPR et explique comment elle est utilisée pour faire la détection des E-ADN. Finalement, la troisième section est une brève revue de la littérature de la eSPR pour la bio-détection et les avantages de ce mode de transduction sont discutés.

2.2.1 Survol

Les biocapteurs SPR incluent une grande variété de capteurs optiques dont le mécanisme de détection est basé sur la sensibilité à l'indice de réfraction des plasmons de surface (SP). Les SP sont une oscillation collective des électrons à l'interface entre un métal et un diélectrique. Leur efficacité en bio-détection provient du fait que leurs propriétés sont fortement dépendantes de l'indice de réfraction du diélectrique à proximité de l'interface. Ainsi, en attachant un élément de bio-reconnaissance à la surface et en monitorant les propriétés du SP, il est possible de détecter le changement d'indice de réfraction provoqué par la capture de la cible [26].

Les propriétés du SP peuvent être sondées avec une lumière incidente en prenant avantage du couplage entre la lumière et les SP. Il faut ainsi retenir que les biocapteurs SPR comprennent toujours trois éléments en commun: une source de lumière (typiquement un laser ou une lumière blanche) incidente sur une structure plasmonique métallique (*e.g.* or, argent, aluminium) avec au moins une dimension nanométrique et un détecteur optique qui récolte la lumière.

Il existe plusieurs géométries et structures de dispositifs qui peuvent supporter les plasmons de surface et coupler avec la lumière incidente. Les structures plasmoniques peuvent être une mince couche métallique [77], un réseau de diffraction [27], un réseau de nano-trous périodiques [78], des nanostructures colloïdales [26], etc (Figure 2.11). Chaque structure montre certains avantages et désavantages qui justifient leur utilisation. Par exemple, les échantillons nanostructurés ne nécessitent pas de prisme coupleur, mais coûtent plus cher à fabriquer. Les nanostructures colloïdales peuvent faire la détection dans un liquide, mais perdent leur stabilité colloïdale dans certains milieux.

La eSPR repose sur l'utilisation d'une structure plasmonique comme électrode dans un système électrochimique. Si presque toutes les structures peuvent être utilisées en combinaison avec l'électrochimie dans la eSPR [79], ce projet est principalement focalisé sur les couches planaires simples.

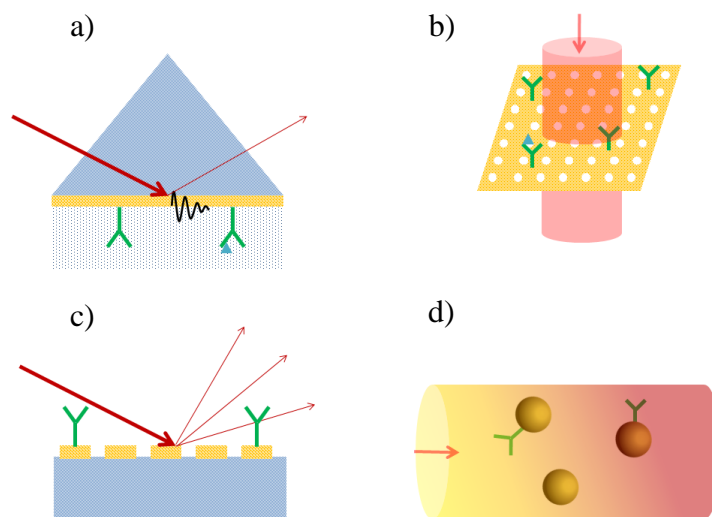


Figure 2.11 : Différentes structures et modes de couplage SPR. a) Film métallique planaire. b) Réseau de nanotrous métalliques en transmission. c) Réseau de diffraction. d) Nanoparticules d'or colloïdales.

2.2.2 Bases théoriques de la résonance du plasmon de surface

La géométrie la plus simple qui peut supporter les plasmons de surface est une interface plane entre un diélectrique et un métal. En raison de sa simplicité, c'est celle qui est la plus répandue dans le domaine de la bio-détection SPR, et il s'agit ainsi d'un modèle adéquat pour comprendre de quelle façon les plasmons de surface peuvent être utilisés pour la détection de biomolécules. Le formalisme de la SPR est décrit en détails dans de nombreux ouvrages et articles [80-82]. Cette section se limitera au calcul des caractéristiques qui seront déterminantes pour les performances finales d'un biocapteur. D'abord, les conditions d'existence des plasmons de surface seront dérivées à partir des équations de Maxwell. Ensuite, les conditions pour le couplage entre une onde électromagnétique et les plasmons de surface seront déterminées et la longueur de propagation du plasmon et la sensibilité dans le milieu diélectrique seront calculées.

Constante de propagation du plasmon de surface

Considérons un guide d'onde composé d'un milieu métallique et d'un milieu diélectrique isotropes non-magnétiques ($\mu=\mu_0$) semi-infinis de permittivité ϵ_m et ϵ_d . Les permittivités des deux milieux dépendent de la fréquence ω et peuvent s'écrire sous la forme complexe:

$$\begin{aligned}\epsilon_m(\omega) &= \epsilon'_m(\omega) + i \epsilon''_m(\omega) \\ \epsilon_d(\omega) &= \epsilon'_d(\omega) + i \epsilon''_d(\omega)\end{aligned}\quad (2.7)$$

Ces deux milieux sont séparés par une interface dans le plan $z=0$, tel que $\epsilon = \epsilon_d$ lorsque $z > 0$, et $\epsilon = \epsilon_m$ lorsque $z < 0$ (Figure 2.12). Le guide d'onde est invariable dans la direction x . Pour qu'une onde puisse se propager à l'interface, son vecteur d'onde doit être orienté selon l'axe x . De plus, considérant la géométrie du problème, les vecteurs de champ dépendent seulement de x et de z .

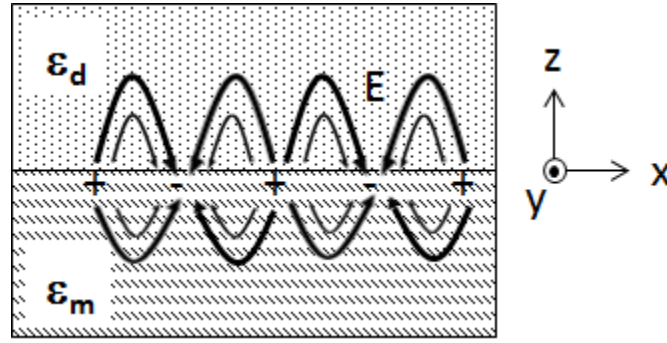


Figure 2.12 : Géométrie du guide d'onde à l'interface entre l'or et le diélectrique.

Les équations de Maxwell décrivant la relation entre le champ magnétique H et le champ électrique E sont:

$$\nabla \times H_i = \epsilon_i \epsilon_0 \frac{\partial}{\partial t} E_i \quad (2.8)$$

$$\nabla \times E_i = -\mu \frac{\partial}{\partial t} H_i \quad (2.9)$$

$$\nabla \cdot (\epsilon_i \epsilon_0 E_i) = 0 \quad (2.10)$$

$$\nabla \cdot (\mu H_i) = 0 \quad (2.11)$$

où l'indice i indique le milieu ($i=d,m$). En appliquant le rotationnel sur les deux premières équations et en les combinant aux deux dernières, les équations d'onde électromagnétiques sont retrouvées:

$$\left(\nabla^2 - \mu \epsilon_i \epsilon_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) E(x, z, t) = 0 \quad (2.12)$$

$$\left(\nabla^2 - \mu\epsilon_i\epsilon_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2}\right)H(x, z, t) = 0 \quad (2.13)$$

Les solutions de Maxwell pour le champ électrique et le champ magnétique prendront la forme générale:

$$E(x, z, t) = e(z)e^{i(\beta x - \omega t)} \quad (2.14)$$

$$H(x, z, t) = h(z)e^{i(\beta x - \omega t)} \quad (2.15)$$

où β est la constante de propagation du mode et ω est sa fréquence angulaire. Elles comprennent des modes polarisés s et des modes polarisés p , pour lesquels l'orientation du champ électrique est respectivement parallèle ou perpendiculaire à l'interface. Dans ce cas, il faut considérer deux catégories de solutions, l'une où le champ électrique est strictement orienté selon y et l'autre où le champ magnétique est strictement orienté selon y . En intégrant ces deux cas généraux dans l'équation d'onde électromagnétique, les deux équations de vecteurs d'onde sont retrouvées:

$$\left(\frac{d^2}{dz^2} - \beta^2 + \mu\epsilon_i\epsilon_0\omega^2\right)e_y(z)e^{i(\beta x - \omega t)} = 0 \quad (\text{Polarisation } s) \quad (2.16)$$

$$\left(\frac{d^2}{dz^2} - \beta^2 + \mu\epsilon_i\epsilon_0\omega^2\right)h_y(z)e^{i(\beta x - \omega t)} = 0 \quad (\text{Polarisation } p) \quad (2.17)$$

La solution générale à cette équation de deuxième ordre est une combinaison linéaire de deux exponentielles:

$$e_y(z) = a_+e^{i\kappa_i z} + a_-e^{-i\kappa_i z} \quad (\text{Polarisation } s) \quad (2.18)$$

$$h_y(z) = b_+e^{i\kappa_i z} + b_-e^{-i\kappa_i z} \quad (\text{Polarisation } p) \quad (2.19)$$

où $\kappa_i^2 = (\mu\epsilon_i\epsilon_0\omega^2 - \beta^2)$. Pour retrouver les autres composantes des champs électrique et magnétiques, il faut appliquer les équations 2.8 et 2.9 sur chacune des solutions et obtenons:

$$h_x(z) = \frac{-\kappa_i}{\mu\omega}(a_+e^{i\kappa_i z} - a_-e^{-i\kappa_i z}) \quad (\text{Polarisation } s) \quad (2.20)$$

$$h_z(z) = \frac{\beta}{\mu\omega}(a_+e^{i\kappa_i z} + a_-e^{-i\kappa_i z})$$

$$e_x(z) = \frac{\kappa_i}{\epsilon_i \epsilon_0 \omega} (b_+ e^{i\kappa_i z} - b_- e^{-i\kappa_i z})$$

$$e_z(z) = \frac{-\beta}{\epsilon_i \epsilon_0 \omega} (b_+ e^{i\kappa_i z} + b_- e^{-i\kappa_i z})$$

(Polarisation p) (2.21)

Appliquons maintenant les deux principales conditions frontières. À l'interface ($z=0$), il doit y avoir égalité entre les composantes tangentielles du champ magnétique et du champ électrique dans chaque matériau, ce qui peut être exprimé:

$$H_{xd} = H_{xm} \quad (2.22)$$

$$E_{xd} = E_{xm} \quad (2.23)$$

Pour la polarisation s , la condition suivante est obtenue:

$$\frac{\kappa_d}{\mu\omega} = \frac{\kappa_m}{\mu\omega} \quad (2.24)$$

$$\epsilon_d = \epsilon_m \quad (2.25)$$

qui implique une égalité des permittivités des deux milieux. Puisque cela est impossible dans la configuration choisie, **la polarisation s n'a pas de mode de propagation.**

Pour la polarisation p , la condition suivante est obtenue:

$$\frac{\kappa_d}{\epsilon_d \epsilon_0 \omega} = \frac{\kappa_m}{\epsilon_m \epsilon_0 \omega} \quad (2.26)$$

qui peut être réduite à l'expression de la constante de propagation du plasmon:

$$\beta = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (2.27)$$

Ainsi, **la polarisation p a un mode guidé.** Les valeurs de κ_d et κ_m sont données par:

$$\kappa_d = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{\epsilon_m}{\sqrt{\epsilon_m + \epsilon_d}}$$

$$\kappa_m = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{\epsilon_d}{\sqrt{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad (2.28)$$

Il faut maintenant noter une deuxième condition, soit qu'il ne peut pas y avoir de propagation dans l'axe des z et que le champ $e_z(x)$ est évanescent dans cette direction. Pour cela, il faut que κ_i soit complexe, ce qui implique que le mode pourra être guidé seulement si les signes

des permittivités des deux milieux sont opposés. Sachant que la permittivité des matériaux diélectriques est typiquement positive, il faut que les matériaux remplissent la condition suivante:

$$\epsilon_m < -\epsilon_d \quad (2.29)$$

Pour l'air ($\epsilon_d \sim 1$), cette condition est remplie pour des métaux tels que l'or et l'argent, dont la partie réelle de la permittivité est négative sur la plage de longueurs d'onde du visible (Figure 2.13).

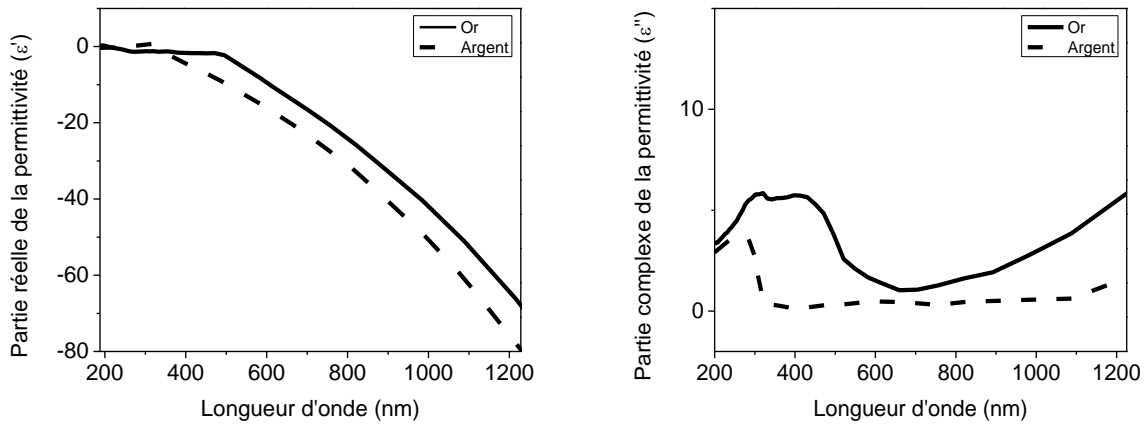


Figure 2.13 : Parties réelles et imaginaires de la permittivité pour l'or et l'argent (données tirées de [83]).

En intégrant les conditions 2.28 et 2.29 dans les équations 2.20 et 2.21, on trouve que pour avoir une onde évanescente d'amplitude décroissante exponentielle dans les deux milieux, b_- doit être nul dans le diélectrique et dans le métal, et les équations des champs sont données par:

$$\begin{aligned} h_y(z) &= b_+ e^{i\kappa_i z} \\ e_x(z) &= b_+ \frac{\kappa_i}{\epsilon_i \epsilon_0 \omega} e^{i\kappa_i z} \\ e_z(z) &= b_+ \frac{-\beta}{\epsilon_i \epsilon_0 \omega} e^{i\kappa_i z} \end{aligned} \quad (2.30)$$

Distance de propagation et profondeur de pénétration du plasmon

L'or et l'argent ont une permittivité imaginaire non-nulle, ce qui signifie que l'énergie du plasmon de surface est absorbée dans le milieu et qu'il a une distance de propagation finie. Dans

les longueurs d'onde du visible, parce que la partie complexe est beaucoup plus petite que la partie réelle, il est possible de réécrire la constante de propagation sous sa forme complexe:

$$\beta = \beta' + i\beta'' = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon'_m \epsilon_d}{\epsilon'_m + \epsilon_d}} + i \frac{\epsilon''_m}{2\epsilon'_m} k_0 \left(\frac{\epsilon'_m \epsilon_d}{\epsilon'_m + \epsilon_d} \right)^{\frac{3}{2}} \quad (2.31)$$

L'amplitude du champ va donc varier selon une exponentielle décroissante sur l'axe de propagation x et la longueur de propagation L où l'amplitude aura diminuée de moitié est donnée par (Figure 2.14 a):

$$L = \frac{1}{2\beta''} \quad (2.32)$$

De la même façon, il est possible de tracer L_{pd} la profondeur de pénétration de l'onde évanescente en z dans le milieu diélectrique en fonction de la longueur d'onde (Figure 2.14 b) à partir de l'équation:

$$L_{pd} = \frac{1}{Re(i\kappa_d)} \quad (2.33)$$

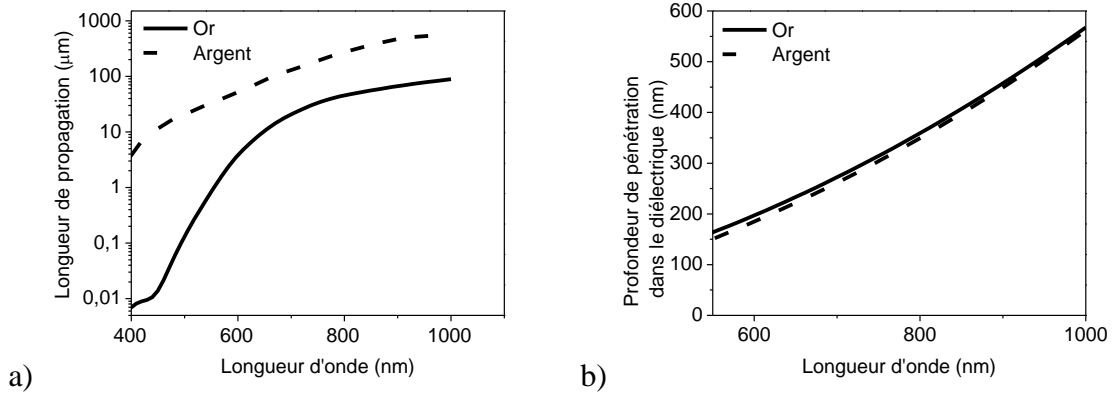


Figure 2.14 : a) Longueur de propagation et b) profondeur de pénétration dans le milieu diélectrique en fonction de la longueur d'onde pour l'or et l'argent dans l'air.

Ces deux paramètres indiquent que, dans l'or et dans les longueurs d'onde du visible, le plasmon de surface peut se propager seulement sur quelques dizaines de microns à l'interface avant d'être absorbé et que le plasmon est sensible aux propriétés optiques du diélectrique à quelques centaines de nanomètres de l'interface.

Couplage onde-plasmon

Le plasmon de surface peut se coupler avec une onde électromagnétique incidente admettant qu'elles soient en accord de phase, c'est-à-dire qu'ils aient la même fréquence angulaire ω et le même vecteur d'onde k . Cet accord est visualisé en traçant les relations de dispersion du plasmon et de la lumière sur un même plan. Pour tracer la relation de dispersion du plasmon, il faut d'abord calculer la permittivité de l'or, qui peut être approximée à partir du modèle de Drude:

$$\epsilon_m(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \quad (2.34)$$

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{\epsilon_0 m_e}} \quad (2.35)$$

, avec ω_p la fréquence plasmon, γ la fréquence d'amortissement des électrons, n la densité électronique du métal, m_e la masse de l'électron, et e la charge élémentaire. Les valeurs numériques de ω_p , γ et n pour l'or sont données dans la littérature [84]. En utilisant cette expression de la permittivité de l'or dans l'équation 2.27, nous obtenons les courbes de la dispersion du plasmon et de la lumière dans l'air (Figure 2.15).

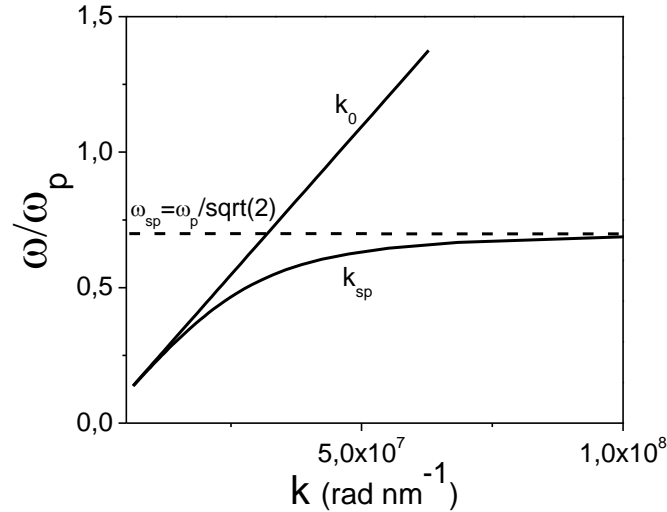


Figure 2.15 : Courbes de dispersion de la lumière et du plasmon de surface dans l'air.

Deux observations peuvent être faites sur ce graphique. D'abord, il met en évidence que la dispersion du plasmon de surface a un caractère asymptotique à hauts vecteurs d'onde et que sa fréquence est limitée par la fréquence plasma du solide tel que:

$$\omega_{sp} = \frac{\omega_p}{\sqrt{1 + \epsilon_d}} \quad (2.36)$$

Ensuite, les courbes de dispersion du plasmon et de la lumière ne se croisent en aucun point, ce qui signifie qu'un accord de phase est impossible dans l'air et qu'aucun couplage onde-plasmon ne pourra se faire.

Pour qu'elles se croisent, il faut diminuer la pente de la courbe de dispersion de la lumière, ce qui résultera en un point de croisement. Pour y arriver, l'approche la plus commune est l'adoption de la configuration Krestchmann, qui consiste en l'ajout d'un prisme coupleur de permittivité $\epsilon_p = n_p^2 > \epsilon_d$ sur le guide d'onde (Figure 2.16). Dans cette configuration, l'onde électromagnétique se propage dans le prisme et vient frapper la surface d'or avec un angle incident θ . Une partie de l'onde est réfléchie et une partie est transmise dans le métal sous forme d'onde évanescence montrant une décroissance exponentielle. Pour une épaisseur de la surface métallique d suffisamment petite ($d < 100$ nm), cette onde évanescence peut traverser l'or et atteindre la seconde interface métal/diélectrique pour se coupler avec le plasmon de surface.

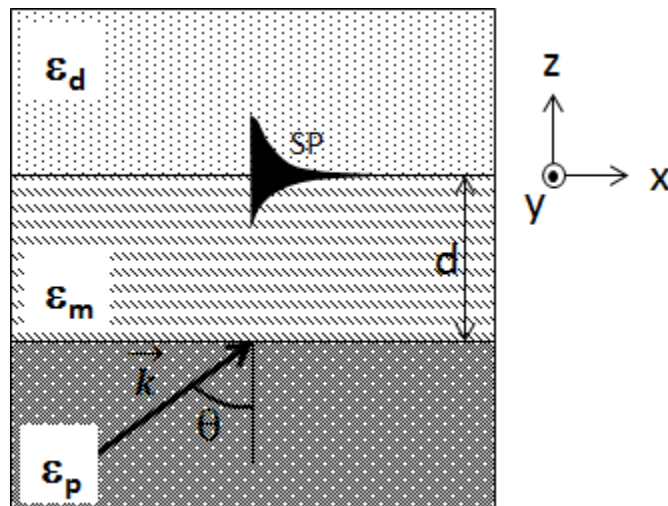


Figure 2.16 : Géométrie du couplage onde électromagnétique et plasmon de surface en présence d'un prisme coupleur.

L'expression pour la constante de propagation de la lumière parallèle à celle du plasmon avec un angle incident θ est ainsi:

$$k_x = k_0 n_p \sin(\theta) \quad (2.37)$$

avec k_0 la constante de propagation dans le vide. En traçant de nouveau les courbes de dispersion pour la lumière et le plasmon de surface, on observe maintenant qu'elles se croisent en un point et que le couplage onde-plasmon est possible (Figure 2.17). On peut ainsi trouver le point de couplage en égalisant les deux constantes de propagation:

$$k_{sp} = k_x$$

$$\frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m(\omega)}{\epsilon_d + \epsilon_m(\omega)}} = \frac{2\pi}{\lambda} n_p \sin(\theta) \quad (2.38)$$

Cette équation met en évidence que le couplage va se produire à condition que trois paramètres soient en accord: ϵ_d la permittivité du milieu diélectrique, λ la longueur d'onde, et θ l'angle d'incidence de la lumière. La Figure 2.17 montre quelques exemples de courbes où les paramètres ϵ_d et θ sont variés, ce qui déplace le λ du point de croisement.

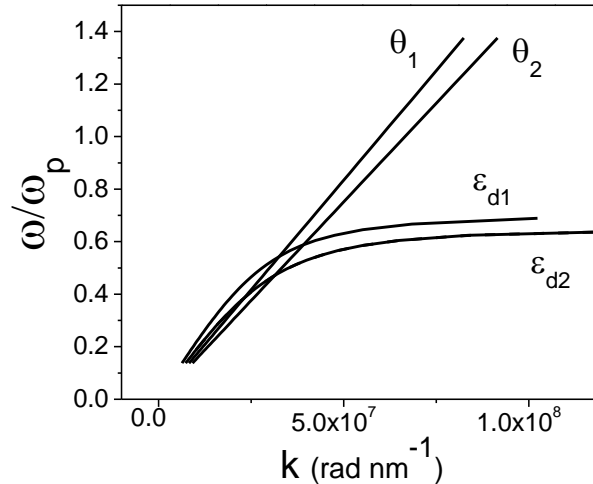


Figure 2.17 : Courbes de dispersion de la lumière et des plasmons de surface en configuration Kretschmann pour différents angles d'incidence et différents milieux diélectriques.

C'est cette dépendance qui est exploitée dans les biocapteurs SPR. En effet, la couche de biomolécules qui s'immobilise à la surface d'or change l'indice de réfraction du milieu diélectrique, ce qui fait varier les paramètres λ et θ pour lesquels il y aura un couplage.

2.2.3 Modélisation des événements de bio-reconnaissance avec la SPR

Il existe deux principales méthodes d'interrogation SPR: l'interrogation spectrale, où l'angle θ est fixé et la longueur d'onde λ est variée, et l'interrogation angulaire, où la longueur d'onde λ est fixée et l'angle θ est varié. Ces deux méthodes vont permettre de sonder le phénomène de résonance plasmonique et d'ainsi obtenir de l'information sur l'indice de réfraction du milieu diélectrique.

Pour retrouver l'angle ou la longueur d'onde de résonance SPR, il faut faire le calcul de la réflexion et en trouver le minimum. Dans le système à deux interfaces étudié, la réflexion R est le carré du coefficient de Fresnel r_g dans la polarisation p qui est donné par [85, 86]:

$$R = |r_g|^2 = \left| \frac{r_{pm} + r_{md} e^{2ik_{mz}d}}{1 + r_{pm}r_{md} e^{2ik_{mz}d}} \right|^2 \quad (2.39)$$

avec

$$r_{pm} = \frac{k_{pz}\epsilon_m - k_{mz}\epsilon_p}{k_{pz}\epsilon_m + k_{mz}\epsilon_p} \quad (2.40)$$

$$r_{md} = \frac{k_{mz}\epsilon_d - k_{dz}\epsilon_m}{k_{mz}\epsilon_d + k_{dz}\epsilon_m} \quad (2.41)$$

et

$$k_{jz} = \left(\frac{\epsilon_j \omega^2}{c^2} - k_x^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{pour } j = p, m, d \quad (2.42)$$

où r_{pm} et r_{ms} sont les coefficients de réflexion de Fresnel en polarisation p pour les interfaces prisme-métal et métal-diélectrique, et k_{pz} , k_{mz} et k_{dz} sont les composantes des vecteurs d'onde selon l'axe z dans le milieu du prisme, du métal et du diélectrique. La réflectivité en fonction de l'angle et de la longueur d'onde est montrée à la Figure 2.18 (a) et (b). Les courbes ont été calculées dans un milieu d'eau et dans un milieu qui diffère de 0.01 RIU (unité d'indice de réfraction) pour mettre en évidence la dépendance de θ_{SPR} et λ_{SPR} à l'indice de réfraction.

Les événements de bio-reconnaissance vont seulement affecter l'indice de réfraction à proximité de la surface. Or, puisque la sensibilité du SPR varie en fonction de la distance de la surface, le modèle doit être adapté pour calculer la quantité de molécules qui ont été capturées à la surface. Il faut modéliser le milieu diélectrique comme un assemblage de n couches qui ont chacune une permittivité différente ϵ_n et une épaisseur d_n et appliquer les coefficients de réflexion de Fresnel obtenus par récurrence. Un exemple de ce calcul pour un milieu d'eau, mais avec une mince couche d'indice qui diffère de 0.01 RIU et d'épaisseur 0, 10 et 50 nm est présenté à la Figure 2.18 (c). Puisque seulement une mince couche à proximité varie d'indice de réfraction, l'angle de résonance est moins affecté que dans les figures (a) et (b).

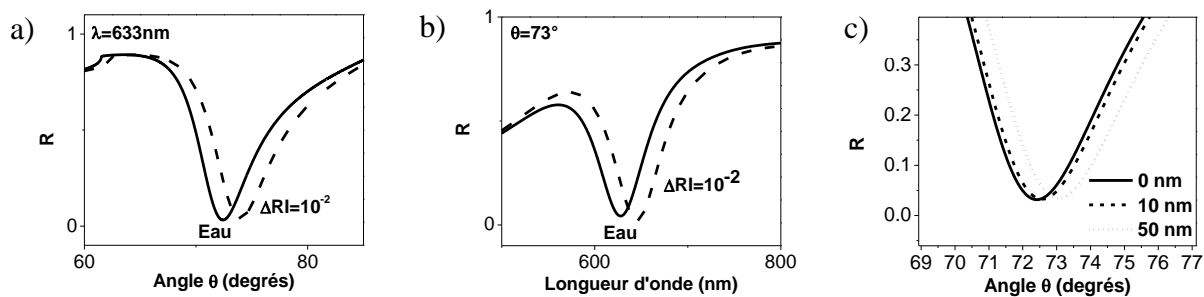


Figure 2.18 : Spectres de la réflectivité dans l'eau en fonction de a) l'angle d'incidence et b) la longueur d'onde. c) Spectres de la réflectivité en fonction de l'angle pour un milieu d'eau et une mince couche d'indice 1.343 de différentes épaisseurs (0, 10 et 50 nm).

Théorie des milieux effectifs

Considérons une bio-couche d'épaisseur d adsorbée sur le film d'or. La bio-couche est constituée de molécules de permittivité ϵ_i (ex. protéines, ADN) qui occupent une fraction volumique δ dans la matrice de permittivité ϵ_d . Selon l'approximation de Maxwell-Garnett, la permittivité effective ϵ_{eff} de la couche est alors donnée par:

$$\epsilon_{eff} = \epsilon_d \frac{2\delta(\epsilon_i - \epsilon_d) + \epsilon_i + 2\epsilon_d}{2\epsilon_d + \epsilon_i + \delta(\epsilon_d - \epsilon_i)} \quad (2.43)$$

2.2.4 Cas d'un milieu diélectrique absorbant

Il a jusqu'à maintenant été assumé que la permittivité du milieu diélectrique sondé ne contenait qu'une partie réelle. Le marqueur bleu de méthylène qui est utilisé dans ce projet a cependant un coefficient d'absorption non-nul sur une partie du spectre visible. L'effet de l'absorption sur les mesures SPR doit ainsi être estimé.

Propriétés optiques du marqueur bleu de méthylène

Dans sa forme oxydée, le bleu de méthylène montre un fort pic d'absorption dans le rouge avec un maximum de $75000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 665 nm (Figure 2.19), ce qui lui donne une couleur bleue caractéristique. Lorsqu'il est réduit en bleu de leucométhylène, le pic d'absorption est atténué et le composé prend une forme transparente dans le visible [87].

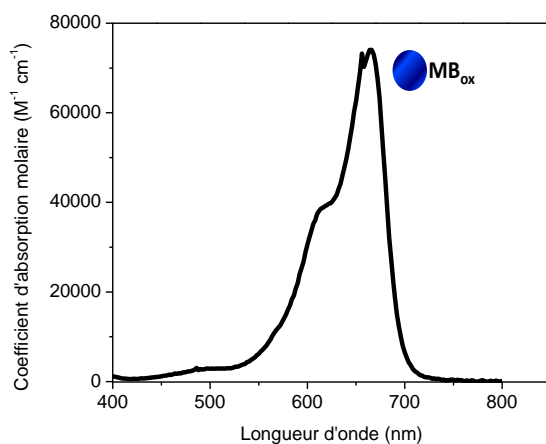


Figure 2.19 : Coefficient d'absorption molaire du bleu de méthylène oxydé en fonction de la longueur d'onde (données tirées de [88]).

Influence de l'absorption sur le pic plasmonique

La Figure 2.18 (a) a montré que la variation de la partie réelle de l'indice de réfraction n modifie l'angle de résonance SPR. La partie imaginaire κ de l'indice de réfraction, reliée à l'absorption du milieu diélectrique, modifie plutôt la profondeur du pic SPR. En utilisant la formule 2.38, la réflectivité en fonction de l'angle d'interrogation a été recalculée pour un milieu à n constant ($n=1.33$), mais à κ variable, et les spectres sont montrés à la Figure 2.20.

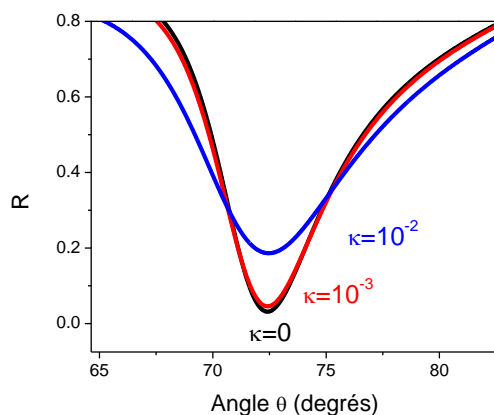


Figure 2.20 : Courbes de réflexion pour un milieu diélectrique avec un indice de réfraction imaginaire κ non-nul (partie réelle n constante).

2.2.5 Mécanisme de détection eSPR

La SPR électrochimique (eSPR) consiste à utiliser la surface d'or sondée en SPR simultanément comme électrode de travail dans un système électrochimique. Or, le développement effectué à la section 2.2.2 a mis en évidence que la SPR est uniquement sensible aux variations dans la permittivité effective du métal et du diélectrique à proximité (<200 nm) de la surface. Ainsi, la eSPR sera sensible aux variations des propriétés optiques du diélectrique et du métal résultants de l'application d'un potentiel sur la surface d'or.

Il existe quatre principales voies par lesquelles les réactions électrochimiques vont affecter les propriétés optiques et, par conséquent, le signal SPR [79, 89]:

- La variation d'épaisseur d'une couche adsorbée à la surface, qui peut provenir de changements structuraux ou d'effets piézoélectriques.
- L'adsorption ou la répulsion d'espèces chargées induite par le champ électrique.
- Les variations d'indice de réfraction d'espèces électro-actives participant à une réaction d'oxydo-réduction.
- La variation de la densité électronique à la surface du métal due à la capacité double-couche.

D'autres effets reliés au réchauffement de l'or [90] et à des changements structuraux de l'or pourraient également être observés à hauts potentiels [79]. Dans le cas des interrupteurs bio-électrochimiques, certaines de ces contributions peuvent être négligées. D'abord, il n'y a pas de phénomène d'électrodéposition dans le système étudié, et donc pas de formation de nouvelles couches. Ensuite, parce que la surface est passivée par un thiol diluant, les espèces électro-actives en solution peuvent difficilement s'approcher l'électrode et participer à une réaction d'oxydo-réduction. Le thiol diluant et la forte concentration ionique viennent faire l'écrantage du champ électrique à proximité de l'électrode et empêche l'attraction électrostatique/électrophorétique d'espèces vers la surface. Il reste que le signal eSPR peut être approximé comme la somme des deux seules contributions suivantes:

Contribution faradique

La contribution faradique est liée au flux de charge qui traverse l'interface métal-électrolyte, par exemple l'échange d'électrons entre les reporteurs de bleu de méthylène et l'électrode d'or. C'est cette contribution qui est d'intérêt dans la détection des interrupteurs bio-électrochimiques. Elle est attribuée à la différence de permittivité entre la forme réduite (MB_{red}) et oxydée (MB_{ox}) du bleu de méthylène. L'indice de réfraction effectif du milieu diélectrique est varié pendant les phénomènes rédox proportionnellement à la différence d'indice $\Delta RI \propto (RI_{MB_{ox}} - RI_{MB_{red}})$ (Figure 2.21).

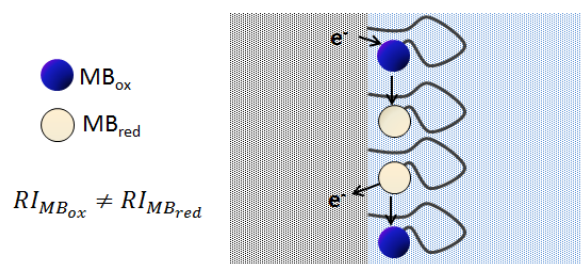


Figure 2.21 : Schéma de la contribution faradique à la réponse SPR dans le cas d'interrupteurs bio-électrochimiques.

Considérons une réaction électrochimique pour laquelle aucune des espèces ne se dépose à la surface de l'électrode. Dans ce cas, l'indice de réfraction à proximité de la surface est déterminé par la concentration d'espèces de bleu de méthylène réduites (C_R) et oxydées (C_O) dans le temps selon l'équation [89]:

$$\theta(t) = B \int_0^{\infty} [\alpha_0 C_0(z, t) + \alpha_R C_R(z, t)] e^{-\frac{z}{L_{pd}}} d\left(\frac{z}{L_{pd}}\right) \quad (2.44)$$

, où α_0 et α_R sont les variations d'indice de réfraction par unité de concentration des espèces oxydées et réduites, B la sensibilité du système SPR, z la distance de l'espèce par rapport à la surface et L_{pd} la profondeur de pénétration du plasmon dans le diélectrique.

Estimons l'effet de la distance z sur l'angle SPR. Dans le cas des interrupteurs, les molécules électro-actives sont fixées près de la surface. Dans la configuration "ON", elles sont à environ 1 nm de la surface, tandis que dans la configuration "OFF", elles sont à 7-11 nm de la surface. En admettant L_{pd} à ~250 nm dans l'or selon la Figure 2.14 (b), la dépendance selon l'axe z devient ainsi à toutes fins pratiques négligeable (différence de ~3% entre les deux états), et la réponse SPR peut être approximée comme directement proportionnelle à la concentration de chaque espèce dans le temps:

$$\theta(t) = B[\alpha_0 C_0(t) + \alpha_R C_R(t)] \quad (2.45)$$

Contribution non-faradique

La contribution non-faradique est celle attribuée au flux de charges qui ne traverse pas l'interface métal-électrolyte associée au mouvement des ions de l'électrolyte. Lorsqu'un potentiel V est appliqué sur l'électrode, l'excès de charge a tendance à résider à la surface du métal. Cette charge va attirer les ions de charge opposée dans la solution près de la surface, ce qui résulte en deux couches de charges opposées séparées par une distance de l'ordre moléculaire d associée aux molécules du solvant (Figure 2.22). Notons que la diffusion des ions a plutôt tendance à les repousser de la surface, et que la concentration des ions en solution va influencer la distance effective entre les deux "plaques" du condensateur, et donc influencer sa capacité [67].

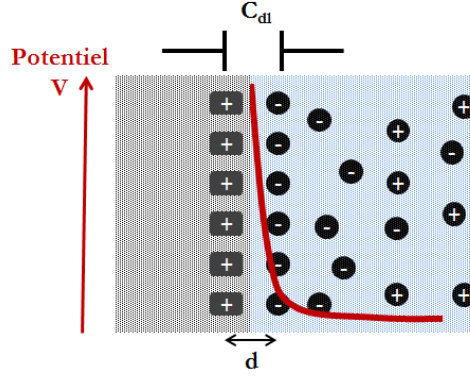


Figure 2.22 : Schéma de la capacité double-couche à l'interface entre l'électrode et le liquide électrolytique.

Calculons la relation entre la capacité double-couche et l'angle SPR [91]. Selon le modèle de Drude, rappelons que la densité d'électrons dans le métal affecte la permittivité du métal selon l'équation:

$$\epsilon_m = 1 - \frac{n_e e^2}{\epsilon_0 m_e \omega^2} \quad (2.46)$$

Dans un mince film de métal d'épaisseur d_m , un changement de charge surfacique $\Delta\sigma_m$ induit une variation de la densité d'électrons Δn_e selon:

$$\Delta\sigma_m = -e d_m \Delta n_e \quad (2.47)$$

En combinant les deux équations précédentes, la relation entre la permittivité du métal et la variation de charge de surface est donnée par:

$$\begin{aligned} \Delta\epsilon_m &= -\frac{\Delta n_e e^2}{\epsilon_0 m_e \omega^2} \\ \Delta\epsilon_m &= \frac{\Delta n_e (\epsilon_m - 1)}{n_e} \\ \Delta n_e &= \frac{\Delta\epsilon_m n_e}{\epsilon_m - 1} \end{aligned} \quad (2.48)$$

En faisant le développement de la relation entre l'angle SPR et les permittivités de milieux donnés à l'équation 2.37, on peut trouver la relation entre l'angle SPR et les variations de permittivité du métal:

$$\begin{aligned}
\sin^2(\theta) &= \frac{\epsilon_d \epsilon_m}{(\epsilon_d + \epsilon_m) \epsilon_p} \\
2 \cos(\theta) \sin(\theta) \Delta\theta &= \frac{\epsilon_d^2}{(\epsilon_d + \epsilon_m)^2 \epsilon_p} \Delta\epsilon_m \\
\Delta\epsilon_m &= \frac{\sin(2\theta) (\epsilon_d + \epsilon_m)^2 \epsilon_p}{\epsilon_d^2} \Delta\theta
\end{aligned} \tag{2.49}$$

Finalement, en combinant l'équation 2.48 avec l'équation 2.49 et en intégrant dans 2.47:

$$\begin{aligned}
\Delta\sigma_m &= \alpha \Delta\theta \\
\alpha &= -\frac{e d_m n_e}{\epsilon_m - 1} \frac{\sin(2\theta) (\epsilon_d + \epsilon_m)^2 \epsilon_p}{\epsilon_d^2} \approx -1482 \frac{C}{m^2 \text{ deg}} \text{ à } 633 \text{ nm}
\end{aligned} \tag{2.50}$$

En intégrant à la relation entre la capacité et la charge de surface, l'effet de la capacité double-couche sur l'angle SPR est donné par:

$$\begin{aligned}
\Delta\sigma &= C_{dl} \Delta V \\
\Delta\theta &= \frac{1}{\alpha} C_{dl} \Delta V
\end{aligned} \tag{2.51}$$

La valeur de C_{dl} est obtenue de façon expérimentale d'après l'analyse du voltammogramme cyclique tel que montré à l'équation 2.3.

2.2.6 Correspondance entre les méthodes électrochimiques et la eSPR

En utilisant la correspondance entre l'angle de résonance SPR (θ) et les paramètres du circuit équivalent électrochimique, il est possible de prédire le comportement de l'angle SPR lorsqu'une méthode électrochimique est appliquée. Il faut s'intéresser au comportement dans les deux méthodes décrites à la section 2.1.4, la voltampérométrie cyclique et la voltampérométrie AC.

Voltampérométrie cyclique

Rappelons que cette méthode consiste à balayer le potentiel V et à mesurer le courant résultant. Le voltammogramme électrochimique est modélisé à la Figure 2.23 (a) et les contributions faradiques (F) et non-faradiques (NF) sont montrées.

Du point de vue SPR, la contribution non-faradique fait augmenter linéairement l'angle θ_{SPR} avec la variation de potentiel tel qu'exprimé à l'équation 2.51. Cette augmentation est liée à l'accumulation de charges surfaciques dans le métal qui forment la capacité double-couche C_{dl} et est modélisé à la Figure 2.23 (b) ligne pointillée (NF).

La contribution faradique est liée à la concentration des espèces réduites et oxydées à proximité de la surface, tel qu'exprimé à l'équation 2.45. Nous avons vu que l'expression qui décrit le taux de transfert d'électrons en fonction de la surtension η doit être résolue numériquement (Équation 2.2), mais qu'elle adopte expérimentalement une forme gaussienne centrée à -275 mV avec une largeur à mi-hauteur de FWHM (Figure 2.8). La concentration des espèces varie ainsi selon l'intégrale dans le temps de la gaussienne, tel que montré à la Figure 2.23 (b) ligne tiretée (F).

La contribution totale pourrait donc être approximée par:

$$\Delta\theta_{SPR}(\Delta V) = \frac{1}{\alpha} C_{dl} \Delta V + B \alpha_R \int_0^{t'} A e^{-\left(-\frac{(\Delta V(t) - 275)^2}{\frac{FWHM^2}{2.35^2}} \right)} dt \quad (2.52)$$

, avec v le taux de balayage du potentiel et A un facteur pré-exponentiel. L'angle SPR mesuré en fonction du potentiel aura donc la forme montrée à la Figure 2.23 (c), qui est la somme des contributions faradique et non-faradique.

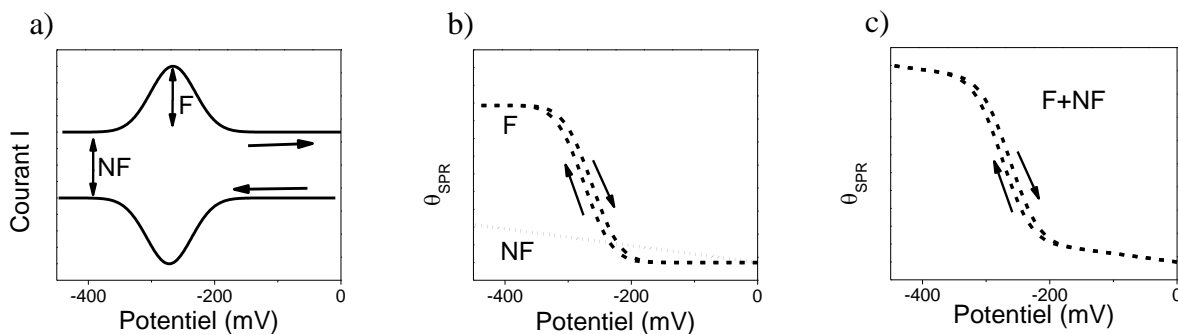


Figure 2.23 : a) Voltammogramme cyclique mesuré par un potentiostat. b) Contributions faradique et non-faradique sur le signal SPR lors d'un voltammogramme cyclique. c) Angle SPR mesuré en fonction du potentiel lors d'un voltammogramme cyclique.

Voltampérométrie à courant alternatif

Rappelons que cette méthode consiste à balayer un potentiel DC surimposée d'une faible composante AC à une fréquence f_{AC} . En électrochimie, le paramètre mesuré est la composante AC du courant généré. En eSPR, le paramètre mesuré est la composante AC de l'angle SPR θ_{SPR} .

La Figure 2.23 (c) met en évidence que la relation entre l'angle θ_{SPR} et le potentiel V est complètement réversible et presque indépendante du sens de balayage. Ainsi, la relation entre $\Delta\theta_{SPR}$ et ΔV est équivalente à la dérivée du voltammogramme cyclique de la Figure 2.23 (c). Pour s'en convaincre, analysons le comportement indépendant des deux contributions.

Pour la contribution non-faradique, l'application du potentiel alternatif va successivement charger et décharger le condensateur double-couche. L'angle SPR va donc varier sinusoidalement à la fréquence f_{ac} et l'amplitude de la sinusoïde est déterminée par la pente de la contribution NF en fonction du potentiel ($\propto C_{dl}/\alpha$). La contribution NF résulte donc une valeur fixe qui est indépendante du potentiel DC.

Pour la contribution faradique, l'application du potentiel alternatif va successivement oxyder et réduire les MB à la surface, ce qui résulte en une modulation sinusoidale de l'indice de réfraction. Loin de E_0 , il n'y a pas d'oxydoréduction et l'angle SPR ne varie pas. Plus le potentiel DC s'approche de E_0 , plus il y a d'oxydoréduction et plus l'amplitude de la sinusoïde sera élevée. La contribution F résulte donc en un pic gaussien centré à E_0 , qui est la pente de la contribution F. La somme des deux contributions résulte en la forme montrée à la Figure 2.24.

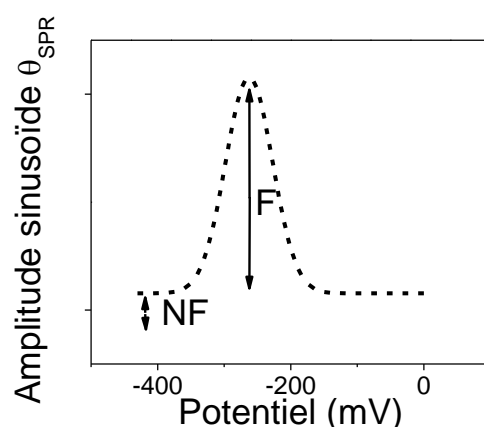


Figure 2.24 : Voltampérométrie à courant alternatif tel que mesuré par SPR.

Mesures à haute fréquence

Noter que pour faire la mesure des voltammogrammes à courant alternatif, il faut suivre l'angle SPR à la fréquence f_{AC} . Or, puisque la mesure du pic SPR entier nécessite au moins une barrette de détecteurs, idéalement une caméra CCD, l'acquisition des données à $>5-10$ Hz n'est pas aisée. C'est pourquoi une approche de mesure en intensité est utilisée. Plutôt que de mesurer le pic SPR en entier et retrouver le $\Delta\theta$, l'angle d'interrogation est fixé à $\theta_{fixé}$ et seulement l'intensité réfléchie est mesurée. Ainsi, le $\Delta\theta$ est mesuré indirectement *via* les variations d'intensité ΔI . Il y a besoin d'un seul détecteur qui peut faire la détection à des fréquences élevées.

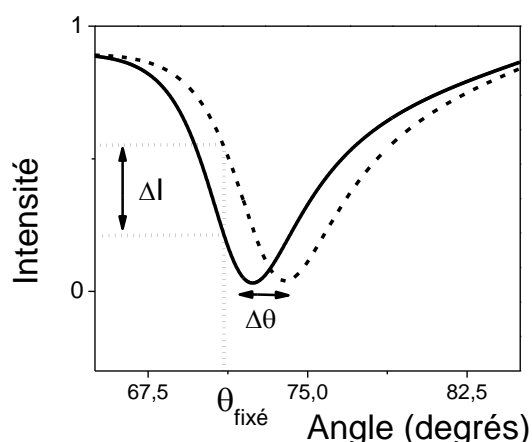


Figure 2.25 : Principe d'interrogation à angle fixé pour mesurer la réponse SPR à des fréquences élevées. La variation d'intensité ΔI est corrélée à la variation d'angle $\Delta\theta$.

2.2.7 Applications et avantages du eSPR

La eSPR offre de nouvelles opportunités pour la détection qui peuvent être divisées en trois principales catégories. D'abord, la combinaison de l'électrochimie et de la SPR peut être utilisée pour simplement augmenter la quantité et la variété des paramètres mesurés de façon à obtenir plus d'informations sur le système. Cette approche est particulièrement utile dans la caractérisation de couches formées par électrodéposition. Par exemple, la eSPR a été utilisée pour caractériser des couches électro-polymérisées [92-94], des couches d'oxyde [95, 96] ou des nanoparticules, où le potentiostat est utilisé pour former et contrôler l'orientation des couches formées tandis que l'indice de réfraction et l'épaisseur de la couche sont estimés par SPR.

Une deuxième approche est l'activation électrochimique d'un phénomène qui est ensuite mesuré par SPR. Un exemple qui est utilisé dans plusieurs capteurs eSPR est le dépôt sur la surface SPR d'une couche de polymère contenant une enzyme de détection, de façon similaire au principe de l'électrode enzymatique. La SPR mesure le changement d'indice de réfraction dans la couche médiatrice dont l'oxydation est contrôlée par la présence du ligand, qui peut être du glucose, de la créatinine ou de la transferrine [97-100]. Un autre exemple est l'utilisation du potentiel appliqué pour influencer les réactions à l'interface. Il a été montré que l'efficacité de l'hybridation peut être augmentée en appliquant un potentiel positif sur l'électrode, ce qui aura pour effet d'attirer les oligonucléotides chargés négativement en solution [101]. Certains protocoles de test ont montré que la surface peut être régénérée à son état initial en appliquant un potentiel sur la surface [102, 103].

La dernière approche est d'utiliser la SPR pour mesurer les processus électrochimiques qui ont lieu à l'interface [104]. En effet, le formalisme de la section 2.2.5 a mis de l'avant que le signal SPR contient certains des paramètres liés au circuit équivalent. La capacité de mesurer ces paramètres optiquement devient particulièrement intéressante lorsque la eSPR est adaptée au format d'imagerie [105]. Puisque le plasmon de surface est uniquement sensible aux propriétés optiques sur sa distance de propagation, il devient utile pour sonder les phénomènes électrochimiques extrêmement localisés [106], ce qui est impossible de faire dans un système électrochimique standard. Cette technique a été utilisée avec un signal alternatif pour mesurer l'impédance locale de surfaces [91, 107], de nanoparticules [108], de cellules [109] et de molécules [110-112]. L'équipe de Tao a notamment montré un biocapteur basé sur l'imagerie eSPR qui détecte le TNT avec une sensibilité qui n'est pas atteignable avec la SPR ou l'électrochimie indépendamment [113].

Les principaux avantages du eSPR en comparaison avec les méthodes SPR et électrochimiques prisent séparément pourraient donc être résumés en cinq points:

i) **Plus de paramètres sensibles** : La eSPR permet d'obtenir simultanément des informations sur les propriétés optiques et électrochimiques à l'interface, ce qui facilite l'interprétation des données et peut aider à discriminer entre les réponses spécifiques et non-spécifiques.

ii) **Potentiel utilisé de manière active** : Le potentiel peut être utilisé pour attirer les espèces en solution ou pour régénérer la surface.

iii) **Imagerie eSPR** : L'adaptation au format d'imagerie permet la multi-détection à haut-débit sur une même électrode, ce qui n'est pas possible en électrochimie. La taille des zones sensibles est limitée par la résolution du eSPR, qui est d'environ $0.2 \times 3 \mu\text{m}$ [113].

iv) **Sélectivité** : La eSPR ne mesure pas la résistance de la solution et est moins sensible à la capacité double-couche en comparaison avec l'électrochimie. En effet, en électrochimie, un électron faradique produit le même signal qu'un électron non-faradique. En eSPR, un électron faradique affecte beaucoup plus la permittivité du diélectrique qu'un électron non-faradique affecte la permittivité du métal. Lorsqu'utilisé avec une modulation, le eSPR est également moins sensible aux changements d'indice de réfraction de la solution ou de l'adsorption non-spécifique [110].

v) **Indépendant de l'électrode** : En électrochimie, c'est le courant total qui passe à travers l'électrode qui est mesuré. Le rapport signal sur bruit va donc dépendre de la taille de l'électrode, et certains effets de diffusion liés à la géométrie de l'électrode peuvent affecter les mesures. En SPR, le signal mesuré est indépendant de la taille de la zone sondée.

CHAPITRE 3 **ARTICLE 1: ELECTROCHEMICAL PLASMONIC SENSING SYSTEM FOR HIGHLY SELECTIVE MULTIPLEXED DETECTION OF BIOMOLECULES BASED ON REDOX NANOSWITCHES**

Ce chapitre est la transcription de l'article accepté pour publication dans *Biosensors and Bioelectronics* (Ref: BIOS-D-15-00361). Il explique la méthodologie utilisée, montre les principaux résultats de bio-détection qui soutiennent l'atteinte des objectifs du projet, et discute des points à améliorer et des perspectives du biocapteur à sélectivité accrue. Noter que "Nanoswitch" est utilisé pour désigner les interrupteurs bio-électrochimiques.

3.1 Authors

Anne-Marie Dallaire^a, Sergiy Patskovsky^a, Alexis Vallée-Bélisle^b, Michel Meunier^a

^a Laser Processing and Plasmonics Laboratory, École Polytechnique de Montréal, Department of Engineering Physics, C. P. 6079, succ. Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3A7

^b Laboratory of Biosensors and Nanomachines, Université de Montréal, Department of Chemistry, C. P. 6128, succ. Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7

3.2 Abstract

In this paper, we present the development of a nanoswitch-based electrochemical surface plasmon resonance (eSPR) transducer for the multiplexed and selective detection of DNA and other biomolecules directly in complex media. To do so, we designed an experimental set-up for the synchronized measurements of electrochemical and electro-plasmonic responses to the activation of multiple electrochemically labeled structure-switching biosensors. As a proof of principle, we adapted this strategy for the detection of DNA sequences that are diagnostic of two pathogens (drug-resistant tuberculosis and E coli) by using methylene blue-labeled structure-switching DNA stem-loop. The experimental sensitivity of the switch-based eSPR sensor is estimated at 5 nM and target detection is achieved within minutes. Each sensor is reusable several times with a simple 8 M urea washing procedure. We then demonstrated the selectivity and multiplexed ability of these switch-based eSPR by simultaneously detecting two different DNA

sequences. We discuss the advantages of the proposed eSPR approach for the development of highly selective sensor devices for the rapid and reliable detection of multiple molecular markers in complex samples.

Keywords: surface plasmon resonance, structure-switching biosensor, electrochemistry, nanosensors

3.3 Introduction

Faster advancement of biosensor technologies for point-of-care applications requires the development of devices that are sensitive, portable, reliable and, most importantly, sufficiently selective to work directly in complex media [114]. Potential solutions for the improvement of existing biosensing methods can originate either from new advancements in technologies or from the combination of well-established approaches that will mutually contribute to the quantity and quality of required analytical parameters. Notable examples of the later strategy are the combination of quartz crystal microbalance and surface plasmon resonance (SPR) [115], dielectrophoresis and nanoplasmonic [116] and not the least SPR and electrochemistry [79, 109, 117].

It has early been established that the application of an electrical potential affects the properties of surface plasmons [118, 119], however the mechanisms behind this effect are still not completely understood [120]. The major contributions have been identified as variations in the electron density at the metal surface, changes in the double layer capacitance, electrochemical formation of an interfacial thin film, and changes in bulk refractive index often induced by redox reactions [89]. The experimental combination of electrochemical and surface plasmon resonance sensing (eSPR) is inherently simple as it only requires a sensing surface that is both conductive and plasmonic (e.g. the conventional gold SPR chip). This technique has been successfully used in a wide range of applications such as thin films characterization [94], the study of redox reactions at a metal/liquid interface [104, 121] and biosensing [21, 98, 122]. One of its main advantages for biosensing is that eSPR is less sensitive to bulk refractive index changes and non-specific adsorption than conventional SPR [110]. In recent years, the Tao group has combined electrochemistry with imaging SPR, achieving high resolution mapping of electrochemical phenomena with a sensitivity that is not obtainable by either method on their own [109, 112,

113], underlining the potential for eSPR as a multi-parametric analytical technique with enhanced performance.

In this paper, we report the development of a new sensing device that combines the sensitivity and multiplexing capability of eSPR methods together with the selectivity and robustness of structure-switching sensors [123, 124]. We expect this combined approach to improve the selectivity of plasmonic sensing in complex media and to have more multiplexing potential than electrochemical sensors.

As a proof of principle model for our eSPR transducer, we first adapted the well-characterized E-DNA sensor "nanoswitch", which consists in a DNA stem-loop [47] that contains an electroactive reporter (e.g. methylene blue MB) at one of its extremity and a thiol group at the other extremity to promote immobilization to the electrode surface (Figure 3.1 a). Upon binding of its complementary DNA sequence or target biomolecule on the loop, this stem-loop undergoes stem opening, which separates the electroactive reporter from the electrode surface, leading to a significant decrease in the electron transfer rate, thus affecting the measurable electrochemical signal. As the conformational changes of the structure-switching probe only occurs upon binding of the specific target, the measured signal is mostly unaffected by nonspecific adsorption of contaminant molecules on the sensor head. In this article we designed and tested a multiplexed eSPR switch sensing device and obtained preliminary experimental results for DNA detection in whole blood, confirming the good potential of the structure-switching sensor for a reliable biosensing in complex samples such as bodily fluids or foodstuffs.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Materials

Labeled oligonucleotide nanoswitches were purchased from Biosearch Technologies (Petaluma, CA). Two oligonucleotide nanoswitches were designed and synthesized: Nanoswitch_1: 5' HS-C6- act ctc caa gcg ccg act gtt gag agg -MB 3' and Nanoswitch_2: 5' HS-C6- act ctc gat cgg cgt tt ta gag agg -MB 3', the first which contains a sequence that is complementary to the rpoB gene of *Mycobacterium Tuberculosis* associated with drug resistant tuberculosis [125], the second with a sequence associated to E coli. Both sequences are modified

on their 5' extremity with a thiol group to promote immobilization to the gold surface and on their 3' extremity with a methylene blue (MB) redox reporter linked to a hexamethylene linker (C6). Both nanoswitches were designed in a stem-loop conformation with a 5 base pair stem that contains 4 GC and 1 AT to insure sufficient stem stability. Oligonucleotides Target_1 (5' tc aa cag tcg gcg ctt gg 3') and Target_2 (5' ctc ta aa acg ccg atc gag 3') were designed to be complementary to Nanoswitch_1 and Nanoswitch_2. Bovine whole blood was purchased from Innovative Research Inc. All other reagents were obtained from Sigma Aldrich.

3.4.2 Sensor preparation

To fabricate the sensing chips, a 5 nm chromium adhesion layer and a 50 nm gold layer were deposited on BK7 glass slides using an electron beam evaporator. Prior to functionalization, slides were cut into smaller 1 cm² chips, cleaned in a fresh "piranha" solution (H₂SO₄ 3:1 H₂O₂) (WARNING : Piranha solution is highly hazardous, handle with care in a fume hood and avoid contact with organic matter), rinsed abundantly in MilliQ water and dried under a N₂ flow. The nanoswitches were immobilized on the sensor surface using thiol-gold chemistry according to the following protocol [63]. To reduce disulfide bonds between the thiol-modified nanoswitches, 2 µL of 100 µM nanoswitches were incubated with 4 µL of 10 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) for one hour at 4°C. This mixture was then diluted with 300 µL of 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.2) to obtain a final concentration of 650 nM nanoswitches. A 200 µL drop of this solution was then deposited on the gold chip and left to incubate for one hour in a humidity chamber consisting of a closed container half-filled with water. The chip was then rinsed with water and incubated in a solution of 2 mM 6-mercapto-1-hexanol (MCH) in PBS at 4°C overnight. MCH is used as a diluent thiol to fill the free sites on the gold and has three main functions: block the surface from non-specific adsorption, prevent the oligonucleotide probes from lying on the surface [126] and passivate the electrode. Before the measurements, the chip was rinsed with water and let to equilibrate in PBS for 10 minutes. Control samples were prepared by incubating freshly cleaned gold chips in a 2 mM MCH solution overnight at 4°C. These control samples resulted in a MCH self-assembled monolayer without nanoswitches.

The **dose-response curves** for individual sensors were obtained by sequentially increasing the target DNA concentration. Dose-response curves were fitted to a single-site

binding mechanism ($[T]$ = target concentration; Amp = Maximum signal attenuation; $C_{50\%}$ = concentration of target at which 50% of the sensor's signaling amplitude is reached):

$$\text{Signal attenuation}_{[T]} = \text{Amp} \frac{[T]}{[T] + C_{50\%}}$$

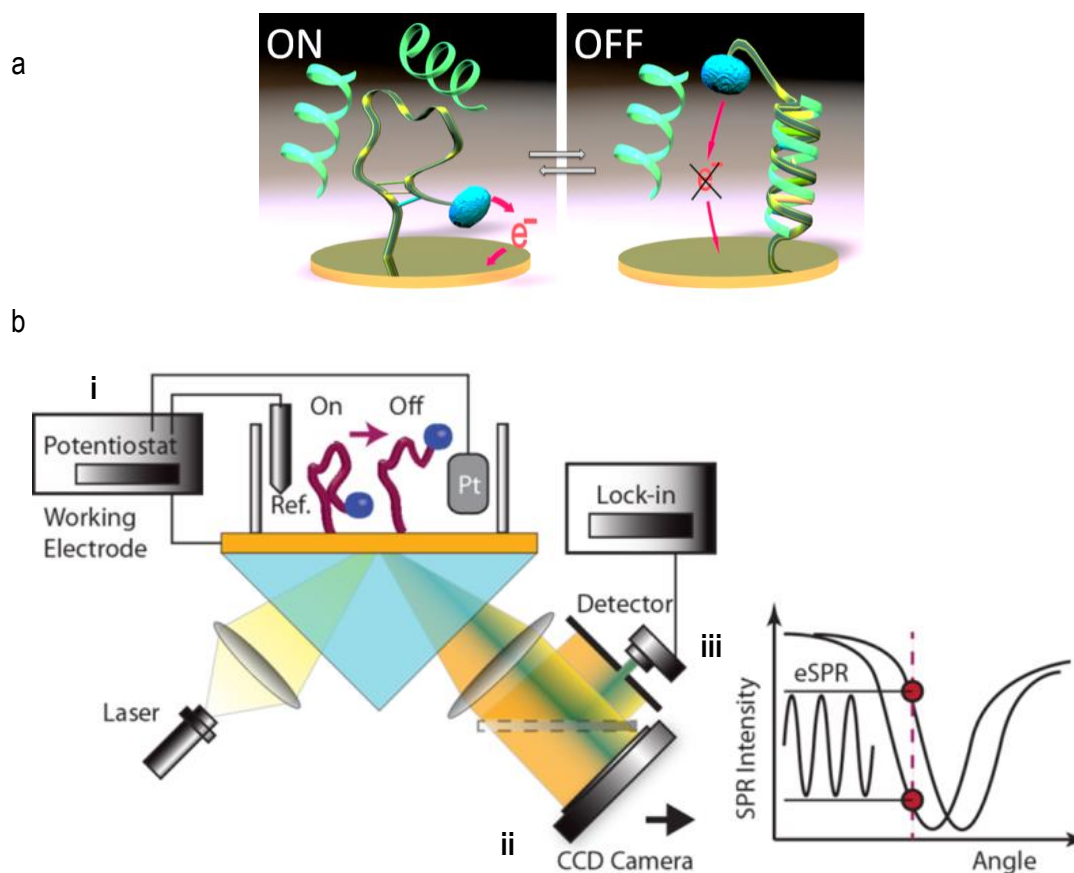


Figure 3.1: a) Schematic of the nanoswitches signalization mechanism. When the target binds the immobilized probe, the switch undergoes a conformational change from the "ON" state to the "OFF" state that increases the distance between the methylene blue reporter (blue sphere) and the electrode, hindering the electron transfer process. b) Schematic of the multi-parametric plasmonic biosensor for the detection of oligonucleotides assisted with electrochemical nanoswitches. A potentiostat is used to measure electrochemical voltammograms (i) and apply the voltage on the gold surface. The light containing plasmonic information is collected in two ways. First, a collimated beam is detected on a CCD camera to obtain the full angular/intensity dependency

used in conventional angular SPR sensing (ii). Second, light from a fixed angle is sent on a photodetector. The average intensity measured by this Si detector is the SPR curve intensity at fixed angle (DC component). The detector is also coupled to a lock-in amplifier to obtain the eSPR signal (AC component) (iii). The inset graph shows the relation between the full SPR curve and the eSPR signal as the refractive index is modulated.

3.4.3 Experimental set-up

We designed the multi-parametric experimental platform presented in Figure 3.1 (b) to perform our synchronous measurements of electrochemical voltammograms, conventional angular SPR dependencies and eSPR signal. A 633 nm laser light source (CrystalLaser), convergence optics and a BK7 coupling prism were used for SPR excitation over a 50 nm surface plasmon supporting gold film in the Kretschmann configuration. The same metal film was used as a working electrode in electrochemical experiments controlled by a ModuLab potentiostat in a three-electrode configuration. The working area of the gold metal film was a 3 mm diameter disk. We used a larger 1 cm platinum disk as a counter-electrode and an Ag/AgCl electrode filled with 3 M KCl electrolyte as a reference. The reference electrode was positioned 2 mm from the working electrode. Upon application of a voltage modulation on the gold film, SPR at a fixed angle generated an electro-optical response (eSPR), which was measured by an amplified Si detector (Thorlabs) connected to a lock-in amplifier (SR830, Stanford Research Systems) (Figure 3.1 b iii). The signal measured by this detector contains two parameters: the average "DC" SPR intensity at a fixed angle, and the "AC" amplitude upon modulation of the refractive index (i.e. the eSPR amplitude, in mV). A teflon measuring open-cell with a capacity of 5 mL was designed and the liquid was agitated at constant speed with a stirrer (Instech) during experiments.

3.5 Results and discussion

3.5.1 eSPR structure switching sensor

The principle behind eSPR sensing relies on the optical detection of the nanoswitches' MB tags redox reaction (Figure 3.2 a). In its initial state, the sensor is covered with nanoswitches in their folded "ON" configuration where their MB group is fixed near the surface. When the potential on the gold surface is swept towards negative values, the MB may gain electrons from

the electrode and be reduced to MB_{red} . When the potential is swept towards positive values, MB_{red} may lose electrons to the electrode and be oxidized to MB_{ox} . Since MB_{red} and MB_{ox} have different refractive indices (RI), what will be sensed by the SPR is a thin layer with an effective refractive index RI_{redON} (at very negative potential) or RI_{oxON} (at less negative potential), with a difference of $\Delta RI_{redoxON}$. When the target binds the nanoswitch, it unfolds to its "OFF" configuration where the MB is brought far from the surface. As the electron transfer rate is highly dependent on the distance to the electrode, less

MB molecules will be oxidized and reduced when the potential is swept, and the difference between RI_{oxOFF} and RI_{redOFF} sensed by SPR will be the lower $\Delta RI_{redoxOFF}$. Therefore, the target can be detected through a measurement of ΔRI_{redox} .

In order to measure ΔRI_{redox} with eSPR, gold samples were functionalized with Nanoswitch_1 and MCH using the protocol from section 2.2. We monitored the immobilization step with angular SPR which resulted in an average shift of $2.3 \times 10^{-3} \pm 7\%$ RIU. Using the Maxwell-Garnett effective medium theory and parameters described in [20], we estimated the filling factor of Nanoswitch_1 to be 22% corresponding to a surface coverage of 5.8×10^{12} nanoswitches/cm². As a control, a second sample was prepared with only MCH.

The first eSPR method tested was to run cyclic potential sweeps in PBS (0 to -450 mV, 10 mV/s) on each sample and to measure the resulting shift in refractive index with angular SPR (Figure 3.2 b). The MCH-modified sample showed a reversible linear increase in refractive index when the potential was swept towards negative values. As there are no MB reporters and therefore no redox reaction, this response is mostly due to the double layer capacitance and other non-specific effects ($\Delta RI_{non-spec}$). On the other hand, the Nanoswitch_1 sample showed a sigmoidal response with maximum slope at -275 mV, the redox potential of MB, as the RI reversibly changes from RI_{oxON} to RI_{redON} when the MB molecules are oxidized and reduced. The $\Delta RI_{redoxON}$ is the difference between the two samples responses and estimated at 3.3×10^{-4} RIU.

However, using this eSPR approach shows no great advantage in comparison with conventional SPR as a control MCH sample is needed to separate the contributions from ΔRI_{redox} and $\Delta RI_{non-spec}$. Nanoswitches are typically detected in the literature using square wave voltammetry, which is much more efficient at distinguishing reactions with different rates and

discarding the non-specific double layer charging current [127]. In this article, we have instead used the similar AC voltammetry technique for its ease of filtering with a lock-in amplifier.

Briefly, this eSPR method consists in applying a sinusoidal perturbation (50 mV, 100 Hz) that will rapidly oxidize and reduce the MB molecules, effectively modulating the refractive index and eSPR signal. This perturbation is superimposed on a linear sweep of potential (0 mV to -450 mV) that results in a peak of the eSPR amplitude around -275 mV typical of the redox activity of MB (Figure 3.2 c). The amplitude of this peak can be correlated with the electron transfer efficiency between MB and the electrode.

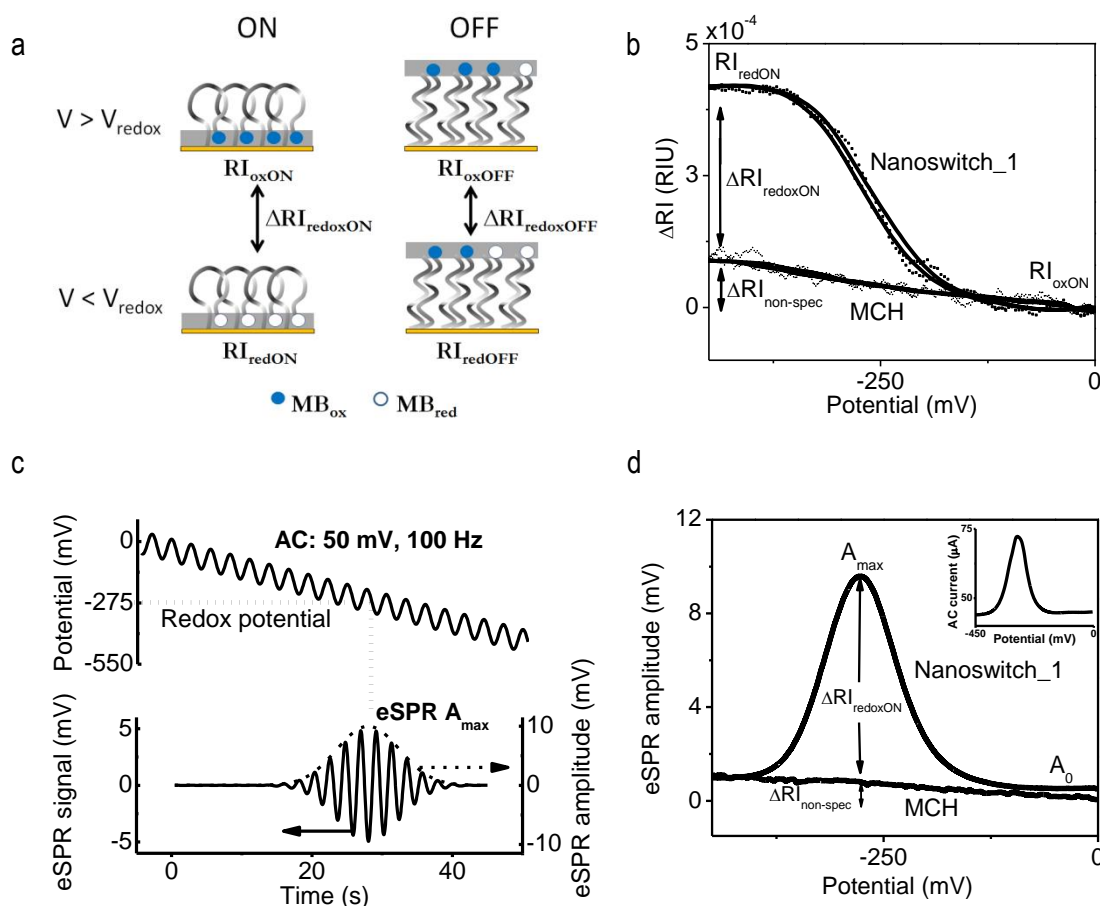


Figure 3.2: a) Schematic of the nanoswitches detection based on the refractive index (RI) changes of the methylene blue (MB) layer. Depending on the ON/OFF state of the switches, more or less MB will be oxidized and reduced as the potential V is swept across the reduction potential V_{redox} . The effective refractive index variation ΔRI_{redox} will therefore be high in the ON state and low in the OFF state. b) Refractive index changes induced by a potential sweep on a Nanoswitch_1-

modified surface in its ON state (i.e. without target) and on a MCH-modified sample. c) Schematic of the eSPR AC voltammetry methodology showing the potential applied to the surface (up) and the resulting eSPR signal and amplitude (down). d) eSPR AC voltammograms measured experimentally for a Nanoswitch_1-modified surface and a MCH-modified surface. For comparison, an electrochemical voltammogram obtained from the same Nanoswitch_1 modified surface is shown (inset).

On Figure 3.2 (d), we show eSPR voltammograms that were obtained experimentally for a Nanoswitch_1-modified surface and for a surface with only a MCH self-assembled monolayer. The MCH sample shows a linear voltammogram of low amplitude A_0 , characteristic of double-layer capacitance. This low signal is expected as MCH passivates the electrode and prevents redox species in solution to reach the surface [106, 107]. The Nanoswitch_1 sample shows two characteristics: at -275 mV, a peak of amplitude A_{\max} associated with the redox activity of MB, and at 0 and -450 mV (i.e. far from the reduction potential), a line of amplitude A_0 . This result indicates that the eSPR redox peak A_{\max} can be normalized in regards to the background line A_0 to separate the selective amplitude response $A=A_{\max}-A_0$. We confirmed that the eSPR peak originates from the redox reaction by comparing with the AC voltammogram obtained with the potentiostat (Figure 3.2 d, inset). Indeed, electrochemical SPR is efficient at reproducing the results obtained with most conventional electrochemical methods, as was already demonstrated by the Tao group [89, 107, 109-111, 113].

We first tested the performance of our eSPR structure-switching sensor by detecting a single stranded DNA sequence in PBS buffer. Using our experimental set-up, we performed synchronous electrochemical and eSPR AC voltammetry measurement of our Nanoswitch_1-functionalised sensor following the addition of various concentrations (0.1 to 1500 nM) of complementary Target_1. Each target concentration was incubated with the sensing chip for 30 minutes before acquisition of the voltammogram. This experiment was repeated on three different samples. We found the eSPR voltammograms for different concentrations of target (Figure 3.3 a) to be almost identical to those monitored with electrochemical method (not shown). The dose-response curves for both eSPR (black circles) and electrochemical (filled black circles) were traced on Fig.3b. As a control, we added up to 1500 nM of a mismatched oligonucleotide

sequence (Target_2) and found no significant signal variation. The experience was repeated to obtain the dose-response curves for the Nanoswitch_2-functionalised sensor using Target_2 (Figure 3.3 b) and again eSPR (red circles) and electrochemical (filled red circles) measurements were concordant.

The noise of the sensor was defined as the standard deviation (SD) over 10 consecutive measurements of the peak amplitude of eSPR AC voltammogram in the blank sample PBS. The limit of detection was set at $3 \times \text{SD}$ and was 5 nM for Target_1 and 10 nM for Target_2. The half-signal attenuation concentrations $C_{50\%}$ measured with eSPR and electrochemistry were respectively 95 and 135 nM for Target_1 and 320 nM and 420 nM for Target_2.

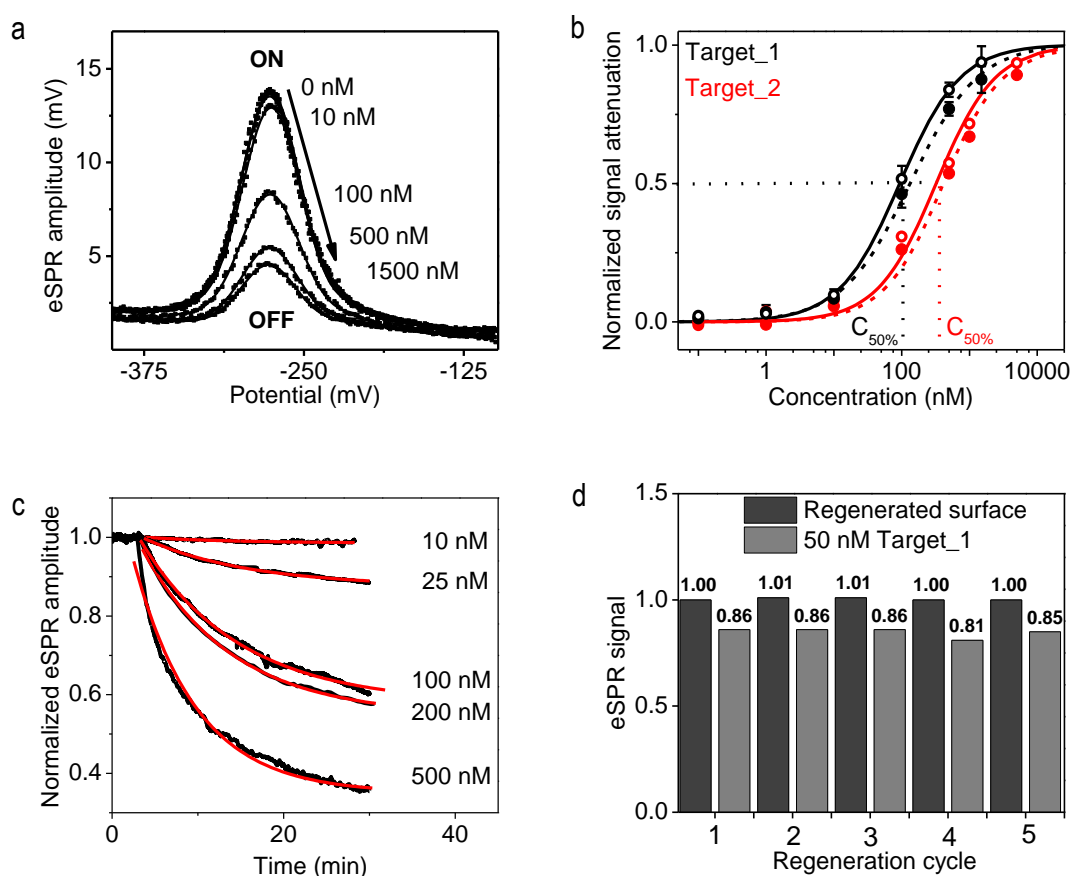


Figure 3.3: Nanoswitches activation by complementary oligonucleotides. a) eSPR AC voltammograms of a sensor functionalized with Nanoswitch_1 for different Target_1 concentrations. As the target concentration is increased, the switches are turned off and the

amplitude of the eSPR redox peak decreases. b) Dose-response curves for the Nanoswitch_1-functionalised sensor with Target_1 (black) and for the Nanoswitch_2-functionalised sensor with Target_2 (red). Responses observed with eSPR (circles, solid line) and electrochemistry (filled circles, dashed line) were concordant. All responses were measured using AC cyclic voltammetry (50 mV, 100 Hz) and normalized in relation to their maximum attenuation. c) Real-time hybridization dynamics for various concentrations of Target_1 obtained with an eSPR impedance method (black). The kinetics were fitted with decaying exponential (red). d) Regeneration of the sensor surface with 8M urea.

We also estimated the binding kinetics of the sensor using an impedance method (DC: -275mV, AC: 50 mV 100 Hz). The kinetics of the Nanoswitch_1/Target_1 hybridization were well fitted with an exponential decay function with lifetime τ (*i.e.* signal is attenuated to 1/e) of 11 ± 1 min on average (Figure 3.3 c). Finally, the sensors were reusable by regenerating them in 8 M urea solution for 5 minutes (Figure 3.3 d). These results confirmed the efficiency of the eSPR approach to monitor the nanoswitch conformational changes.

3.5.2 Measurements in whole blood

Electrochemical structure-switching sensors have proven to be more effective than SPR label-free method for biosensing in complex samples such as blood plasma and foodstuffs [54, 124, 128]. This is due to the fact that structure-switching mechanisms requires a significant input in energy (> 3 kCal/mol [129]) *via* a very specific binding event in order to be activated. This highly specific binding energy input (loop binding, which triggers stem opening in the case of E-DNA) cannot generally be provided by non-specific absorption on the sensor head. We therefore tested the performance of our switch-based eSPR sensor directly in whole blood. For these tests, we functionalized the gold surface with MB-containing Nanoswitch_2. We first measured the blank eSPR voltammogram in PBS, then added 200 nM of Target_2. The target was incubated for 40 minutes before measurement of the response eSPR voltammogram (Figure 3.4 a, black). During incubation, real-time hybridization dynamics were obtained with impedance method by fixing the potential at -275 mV and applying a small 50 mV perturbation at 100 Hz (Figure 3.4 b, black). These parameters were found suitable after analysis of the Bode plot and fitting with the

equivalent circuit presented in [68]. The sensor was then regenerated using the 8M urea washing procedure, and the test was repeated using whole blood as a blank media (Figure 3.4 a,b red). The signal attenuation compared to blank values was of 43% in buffer and 46% in whole blood. They displayed similar response time in both media with $1/e$ signal decrease taking place within 11.5 minutes (Figure 3.4 b). In contrast, the angular SPR generated a very high response in the whole blood media and no clear dynamics could be observed upon addition of the target (not shown). These results confirm that electrochemical structure-switching plasmonic sensing displays a high selectivity in complex media such as bodily fluids and may be of great potential for point-of-care applications. However, it should be noted that due to the high refractive index difference between PBS and whole blood ($\Delta RI \sim 6 \times 10^{-2}$ RIU), the sensor needs to be calibrated in each media before the test (see section 3.5.4).

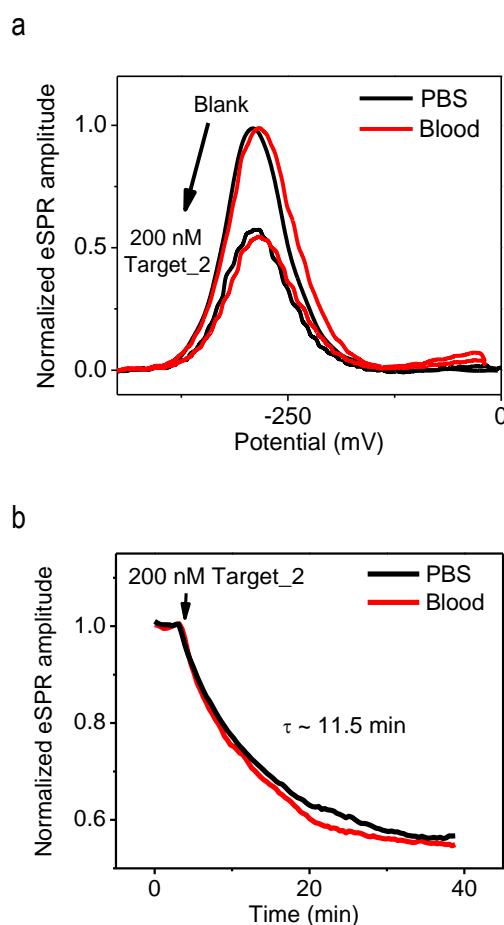


Figure 3.4: a) Normalized eSPR voltammograms of a Nanoswitch_2-modified gold surface in PBS and whole blood media. Voltammograms were acquired before and after 40 minutes

incubation with the target oligonucleotide Target_2. b) Real-time eSPR dynamics of hybridization between Nanoswitch_2 and Target_2.

3.5.3 Multiplexing and differential measurements

An important advantage of the SPR methods is that the optical excitation of surface plasmons facilitates highly multiplexed detection in an array format [105]. Indeed, while electrochemistry offers no spatial resolution and is limited to measuring all the current flowing through the electrode, eSPR has the ability to map the redox potential amplitude with high spatial resolution, allowing for multi-sensing and even imaging [113]. As a proof of principle for multi-detection, here we present results for the simultaneous detection of two target oligonucleotides Target_1 and Target_2 by using complementary nanoswitches Nanoswitch_1 and Nanoswitch_2 attached to the same working electrode. In this experiment, SPR reflection from two illuminated spots functionalized with Nanoswitch_1 and Nanoswitch_2 is detected by two silicon detectors connected to the inputs of a lock-in amplifier (Figure 3.5 a). As shown on the set-up schematic, we used a planar geometry of counter and reference electrodes that greatly facilitate sensor application in the portable format with microfluidic liquid delivery [128]. To facilitate the alignment of the double-beam for surface plasmon excitation, a BK7 dove prism was used for coupling. Using this experimental setup, we monitored in real time the successive addition of Target_1 and Target_2 using a single functionalized working electrode (Figure 3.5 b). By introducing 1D or 2D translation of the excitation beam we can therefore map multiplexed-electrodes where independent sensor density will be limited only by the surface plasmon propagation length or precision of DNA surface functionalization.

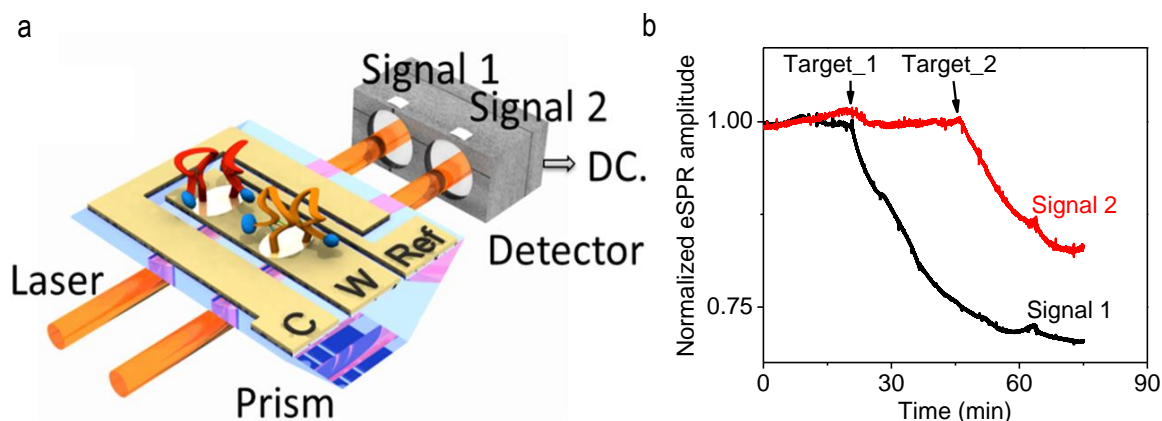


Figure 3.5: a) Multiplexed eSPR set-up. Nanoswitch_1 and Nanoswitch_2 are immobilized on two separated spots of the same working electrode immersed in the same liquid sample. b) 100 nM Target_1 and Target_2 are subsequently added to the testing media.

3.5.4 eSPR calibration and effect of non-specific interactions

As the eSPR method is based on a modulation of the SPR intensity at fixed angle, the eSPR amplitude is proportional to the differential of the angular SPR curve (Figure 3.6). Therefore, the eSPR maximum sensitivity will be achieved when measuring at the angle of maximum deviation point of the SPR dependence. However, since the differential of the SPR curve is not constant along the curve, any phenomenon that changes the experimental angle of incidence or leads to the shift of resonance curve will influence the sensor response. This is why we define the eSPR calibration parameter, which is the relative amplitude of the eSPR signal at a given angle/RI shift compared to the maximum sensitivity point. It is used to correct the effect of changes in RI to the eSPR amplitude and is directly obtained from the normalized derivative of the SPR peak. While it is very important to finely tune SPR angle at the start of experiments to the maximum sensitivity point, we observed that bulk refractive index changes up to 10^{-3} RIU had a calibration parameter >0.99 which did not considerably affect the eSPR signal (Figure 3.6 inset). We tested with conventional SPR that hybridization of saturating concentrations of target molecules in buffer resulted in RI changes $<10^{-3}$ RIU, and therefore did not need to be corrected. In some cases, it is however necessary to eliminate possible error linked to the formation of a nonspecific thin film at the surface of the sensor or by a change in the bulk refractive index of the sample. To do so, we tested three methods. Using the full SPR curve measured with conventional

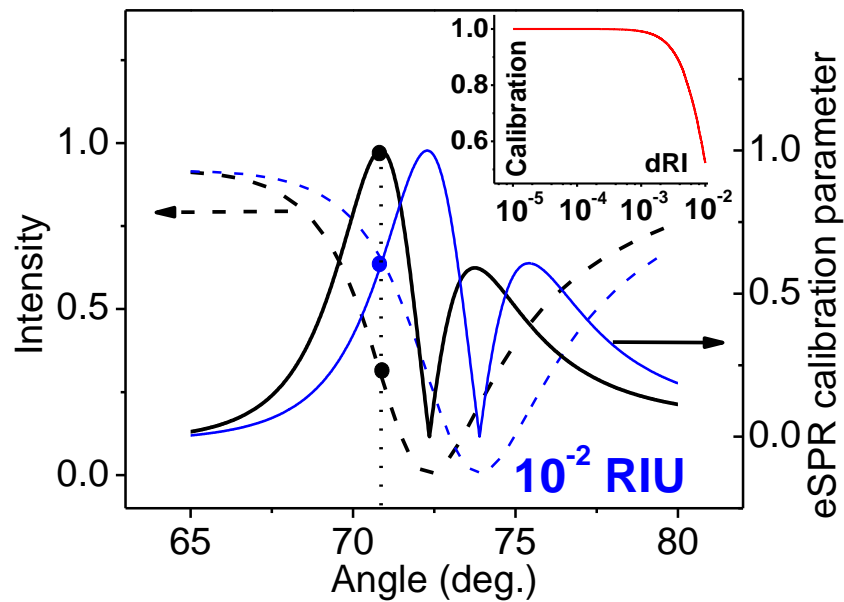


Figure 3.6: Theoretical SPR angular intensity dependences (dashed) for 50 nm gold film in a water medium (black line) and shifted by 10^{-2} RIU changes (blue line). Solid lines provide the eSPR calibration parameter that corresponds to the normalized SPR curve derivative. As eSPR is measured at a fixed incident angle (dotted line), the eSPR amplitude will be affected by the bulk RI. Inset: Calibration parameter dependence on the bulk RI.

angular SPR, we measured the resonant angle shift between the blank and after hybridization of the target, then recalculated the eSPR calibration parameter. A second approach consisted in repeatedly readjusting the incident angle at the maximum deviation point of the SPR curve. Although it requires a complicated experimental set-up, the later method was needed in this article to measure in two medium with very different RI such as PBS and whole blood. A third, simpler approach that provided a satisfactory result was to perform continuous measurement of the SPR curve intensity at the detection angle, which is obtained from the average intensity measured by the Si detector (DC component described in Fig1b schematics). The DC amplitude follows the development of the SPR curve (Fig.6), which helps to eliminate nonspecific responses.

3.6 Conclusion

In this paper we proposed to combine the high sensitivity and multiplexing capability of eSPR method together with the high selectivity and robustness of structure-switching sensor in order to resolve several limitations of current biosensor for point-of-care applications. We did this by combining electrochemical and SPR characterization of a DNA-based structure-switching sensor that initiate spatial redox reporter displacement. This switch-based eSPR sensor displays a detection limit of 5 nM oligonucleotide and works as well in whole blood than in buffer. The multiplexing potential of this switch-based eSPR sensor was highlighted by simultaneous detection of two different oligonucleotide targets using two distinct nanoswitches attached to the same working electrode. This sensor supports the use of simplified planar electrodes for electrochemical scanning and can be implemented in a portable device arrangement with microfluidic and disposable sensing chips.

3.7 Acknowledgement

This work was funded by the Team Research Project Program of Fonds de recherche Nature et technologies (Québec, Canada). Anne-Marie Dallaire would like to thank NSERC for the graduate scholarship. Alexis Vallée-Bélisle is a fellow from le Fond de Recherche en Santé du Québec and is the Canada Research Chair in Bio-engineering and Bio-nanotechnology.

CHAPITRE 4 CARACTÉRISATION ET DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans ce chapitre sont résumées des étapes de caractérisation et des résultats complémentaires à ceux présentés dans l'article du CHAPITRE 3. La première section traite des modèles plasmonique et électrochimique utilisés pour estimer la densité de fonctionnalisation des interrupteurs à la surface. La deuxième section introduit brièvement la possibilité de faire la détection par la phase du signal eSPR. La troisième section discute des considérations méthodologiques en termes de sensibilité à l'absorption du marqueur optique, à la permittivité milieu de test, à la force ionique du milieu de test, au bruit de la source et à la dérive du signal.

4.1 Caractérisation de la densité de fonctionnalisation

Il est bien établi dans la littérature que plus la densité de fonctionnalisation des oligonucléotides sur une surface planaire est élevée, plus il y a de répulsion stérique qui empêche la cible de s'approcher du récepteur, résultant en un faible taux d'hybridation [130, 131]. L'effet de la densité de fonctionnalisation sur les réponses obtenues dans le cas des E-ADN de type tige-boucle a été étudié par Ricci *et al.* [74]. Ils ont vérifié qu'en variant la concentration de E-ADN utilisées à l'étape 2 du protocole expérimental entre 5 nM et 5 μ M, la densité d'interrupteurs à la surface peut être ajustée sur deux ordres de grandeur, passant de 3.9×10^{10} interrupteurs/cm² à 2.1×10^{12} interrupteurs/cm², correspondant à une distance moyenne entre les oligonucléotides de ~50 nm à ~5 nm. Leurs résultats ont indiqué qu'il est préférable de travailler à haute densité de fonctionnalisation. En effet, il faut rappeler que la signalisation dépend de la distance du marqueur rédox de la surface. À faible densité, il y a peu de répulsion stérique et le complexe récepteur/cible est flexible. Le marqueur passe plus de temps près de l'électrode, résultat en un taux de transfert d'électrons élevé dans la configuration "OFF". À l'inverse, une haute densité de fonctionnalisation augmente la répulsion stérique et, par le fait même, diminue le taux de transfert dans la configuration "OFF", augmentant la signalisation du senseur (Figure 4.1).

Pour obtenir la plus grande différence de signal entre l'état ON et OFF, il faut éviter que les interrupteurs dans l'état OFF ne se couchent à la surface, ce qui peut être assuré par une densité de fonctionnalisation élevée. La densité de fonctionnalisation est contrôlée par la concentration de la solution de E-ADN utilisée dans l'étape d'immobilisation. Le coût de cette solution est cependant relativement élevé, à environ 2.5\$ par échantillon fonctionnalisé à 1000

nM. Pour minimiser les coûts, il faut déterminer la concentration de la solution de E-ADN la plus faible qui permettra d'atteindre une densité de fonctionnalisation maximale. La densité de fonctionnalisation des interrupteurs en fonction de la concentration de la solution de E-ADN a été modélisée et caractérisée sur un système plasmonique et électrochimique.

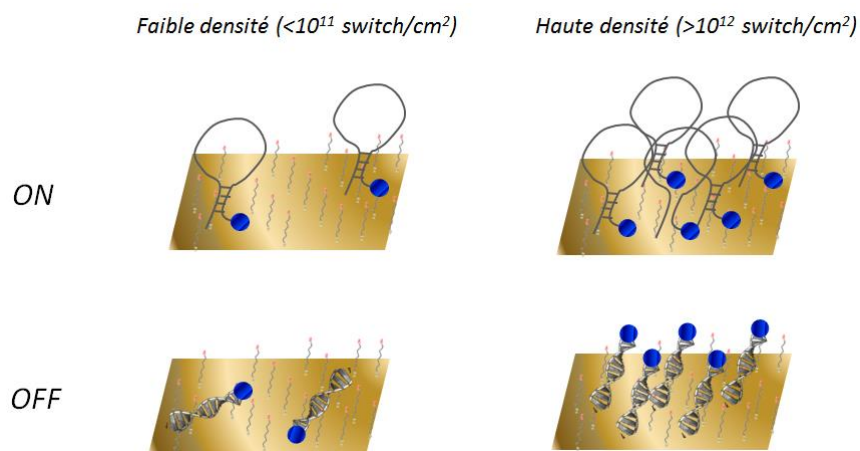


Figure 4.1 : Schéma de l'organisation des interrupteurs bio-électrochimiques à la surface de l'électrode en fonction de la densité d'oligonucléotides à la surface

4.1.1 Modélisation plasmonique

La densité de fonctionnalisation peut être estimée à partir des courbes d'immobilisation des interrupteurs sur la surface d'or. La procédure en trois étapes est la suivante:

Mesure du $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ de l'immobilisation

La mesure du changement d'indice de réfraction engendré par l'attache des E-ADN sur la surface se fait sur un système SPR angulaire conventionnel. Les sensogrammes types sont montrés à la Figure 4.2. L'immobilisation se fait en trois étapes. D'abord, l'échantillon d'or est placé dans le système SPR et une goutte de la solution tampon est déposée à la surface pour obtenir la ligne de base. Ensuite, un certain volume de la solution de E-ADN concentrée à 1 μM est ajouté au tampon pour ajuster la concentration finale des E-ADN (ex. 200, 400 ou 600 nM). Après une heure d'incubation, la solution de E-ADN est retirée et la surface est rincée à plusieurs reprises avec le tampon pour déloger les oligonucléotides attachés de façon non-covalente à la surface. En mesurant l'angle de résonance avant et après l'incubation des interrupteurs sur la

surface, la variation d'indice de réfraction peut être estimée en connaissant la sensibilité du système (dans ce cas $273^\circ/\text{RI}$).

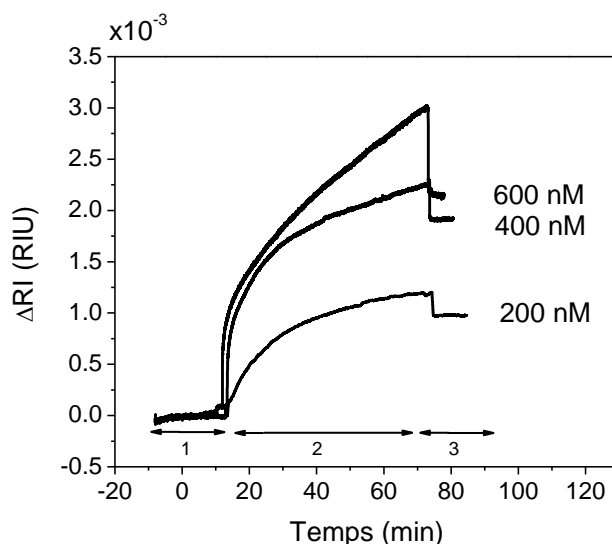


Figure 4.2 : Sensogrammes de l'immobilisation de différentes concentrations de solution d'interrupteurs sur une surface d'or mesurée par SPR angulaire. 1- Ligne de base dans la solution tampon, 2- Ajout de la solution de E-ADN et immobilisation, 3- Nettoyage avec la solution tampon.

Modélisation optique des E-ADN

Pour faire la relation entre le changement d'indice mesuré par SPR et la densité de E-ADN à la surface, il faut connaître de quelle façon l'interrupteur affecte la permittivité du diélectrique. Deux principaux paramètres sont à prendre en considération : la géométrie (longueur et diamètre) et l'indice de réfraction de l'oligonucléotide.

L'ADN simple-brin a une longueur de 0.63 nm/nucléotide [132] et subit une contraction pendant l'hybridation avec un autre brin, résultant en une longueur de 0.33 nm/nucléotide pour de l'ADN double-brin. En considérant la taille du liant C6-SH (hexanethiol), des tailles de 6.6 nm pour l'interrupteur en conformation tige-boucle et de 11.1 nm pour l'interrupteur hybridé avec sa cible sont estimées (Figure 4.3). Les indices de réfraction de l'ADN simple-brin et double-brin sont issus de la littérature [133] et celui du liant C6-SH est issu de la fiche de données de *Sigma Aldrich*. Le bleu de méthylène peut être approximé comme une monocouche de 0.7 nm. Son

indice de réfraction n'est pas disponible dans la littérature, il sera approximé à 1.36 (voir Annexe 1).

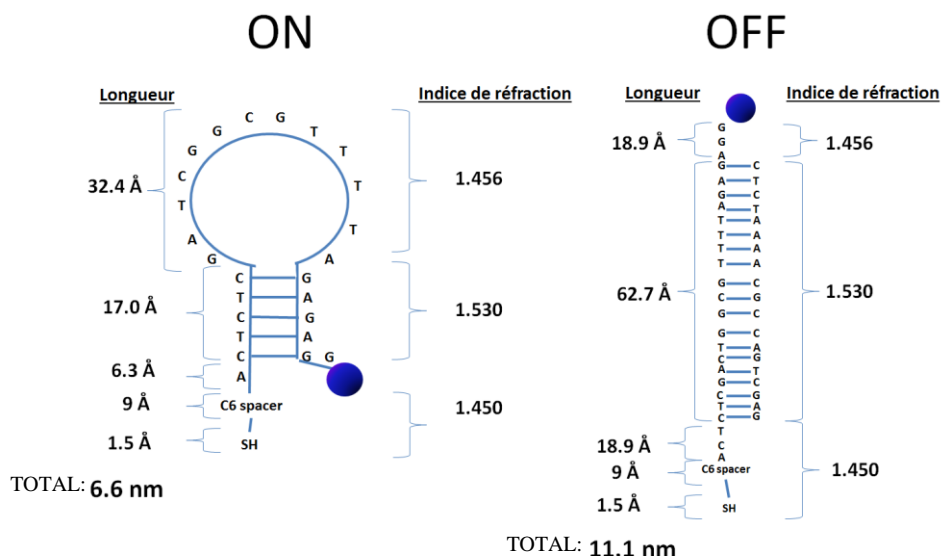


Figure 4.3 : Modélisation optique des interrupteurs bio-électrochimiques dans la configuration ON et OFF.

Calcul de la densité de fonctionnalisation

La densité de fonctionnalisation est estimée en incluant dans le modèle de la section 2.2.2 quatre couches d'indice de réfraction 1.45, 1.36, 1.530 et 1.456 d'une épaisseur de 1 nm, 0.7 nm, 1.7 nm et 3.2 nm respectivement. Le pourcentage de recouvrement de la surface selon le modèle des milieux effectifs de Maxwell-Garnett est ensuite varié jusqu'à ce que la variation d'angle de résonance modélisé par rapport à la solution tampon soit égale à la variation d'indice de réfraction mesurée lors de l'immobilisation. En approximant la sonde par un cylindre de 2.2 nm de diamètre, la densité est retrouvée avec la formule suivante:

$$Densité \left(\frac{switch}{cm^2} \right) = Recouvrement (\%) \times \frac{1}{\pi (1.1 \times 10^{-7} cm)^2 (switch^{-1})} \quad (4.1)$$

Le Tableau 4.2 donne les recouvrements estimés et les densités associées pour certaines concentrations et la Figure 4.4 montre les résultats sous forme de graphique. La saturation se produit à partir de 1000 nM à une densité près de 10^{13} interrupteurs/cm², bien que la densité soit suffisamment élevée à partir de concentrations de E-ADN de 600 nM.

Tableau 4.1: Recouvrement et densité de fonctionnalisation en fonction de la concentration de la solution d'E-ADN caractérisés par SPR.

	200 nM	400 nM	500 nM	600 nM	1000 nM
Recouvrement	13%	26%	34%	31%	36%
Densité (E-ADN/cm ²)	3.4x10¹²	6.8x10¹³	8.9x10¹²	8.1x10¹²	9.4x10¹²

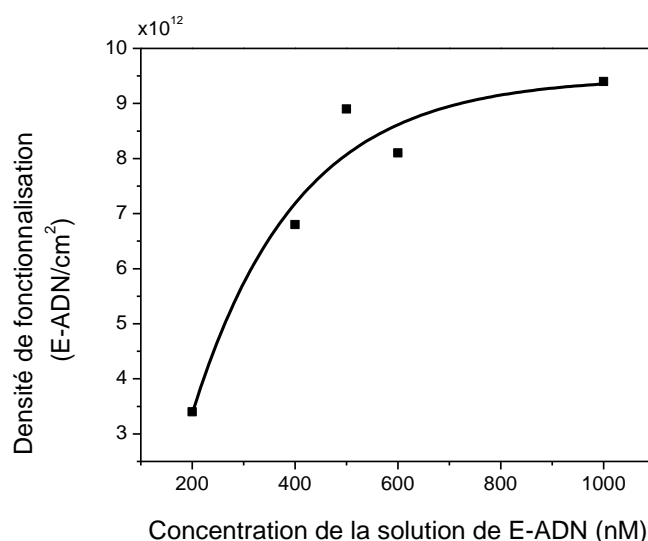


Figure 4.4 : Densité de fonctionnalisation en fonction de la concentration de la solution de E-ADN utilisée tel que modélisé par SPR.

4.1.2 Modélisation électrochimique

La modélisation électrochimique se fait à partir de voltammogrammes cycliques mesurés sur une surface fonctionnalisée. Tel qu'indiqué à la section 2.1.4, équation 2.6, l'aire sous le pic rédox est directement reliée au nombre d'électrons échangés. En considérant que la réaction d'oxydoréduction du bleu de méthylène nécessite deux électrons, le nombre total de bleu de méthylène sur la surface est estimé en intégrant l'aire du pic rédox et en divisant par deux. La densité est ensuite recalculée en divisant par l'aire totale de l'électrode selon la formule:

$$\text{Densité} \left(\frac{\text{switch}}{\text{cm}^2} \right) = \frac{\text{Charge}(C)}{1.602 \times 10^{-19} \left(\frac{C}{e^-} \right)} \times \frac{1}{2} \left(\frac{\text{switch}}{e^-} \right) \times \frac{1}{0.070 (\text{cm}^2)} \quad (4.2)$$

Un exemple de voltammogramme cyclique est montré à la Figure 4.5 (a). Pour obtenir l'aire sous la courbe du pic de réduction, la ligne de base de la capacité double-couche a d'abord été soustraite pour conserver uniquement le pic de réduction. Le courant a ensuite été intégré en fonction du temps (vitesse de balayage de 100 mV/s) pour obtenir la charge en fonction du voltage présenté à la Figure 4.5 (b). Les valeurs étaient typiquement de l'ordre des nano-Coulombs. La densité de fonctionnalisation en fonction de la concentration de E-ADN est montrée à la Figure 4.6. Le comportement général est le même que celui obtenu par la caractérisation SPR, soit que la saturation est atteinte vers 1000 nM, et que l'utilisation d'une concentration de ~600 nM permet d'obtenir une haute densité toute en diminuant les coûts presque de moitié. Cependant, les valeurs calculées de densités sont différentes d'un facteur ~6. Il faut comprendre que les deux méthodes sont basées sur plusieurs approximations. D'abord, l'électrochimie mesure l'ensemble des interrupteurs présents sur l'électrode, tandis que la SPR fait la mesure sur une aire beaucoup plus petite, ce qui peut être erroné si la fonctionnalisation est spatialement hétérogène. Il est également possible que certains groupements MB ne soient pas actifs, soit en raison de la conformation de l'interrupteur ou de la présence de la monocouche de MCH, et ils ne seraient ainsi pas comptés en électrochimie. Il reste que dans les deux cas la densité calculée est plus haute que 10^{12} interrupteurs/cm², ce qui nous place définitivement dans un régime à haute densité.

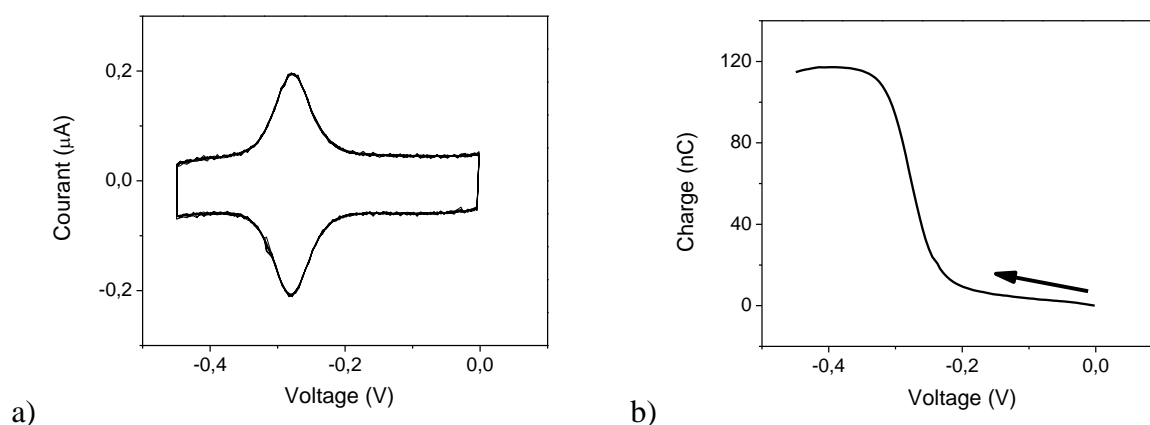


Figure 4.5 : a) Voltammogramme cyclique mesuré sur une surface fonctionnalisée avec des interrupteurs. b) Charge négative fournie par l'électrode pendant la réduction du MB en fonction du voltage.

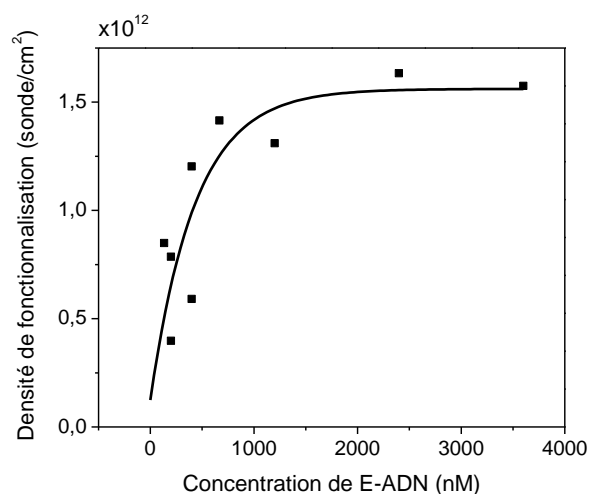


Figure 4.6 : Densité de fonctionnalisation en fonction de la concentration de la solution de E-ADN utilisée tel que modélisé par électrochimie.

4.2 Détection avec la phase eSPR

Les méthodes de détection eSPR sont basées sur l'application d'une perturbation sinusoïdale sur l'électrode. Dans le cas de la voltampérométrie AC, la sinusoïdale est surimposée sur un potentiel DC en rampe, tandis que pour la détection en temps réel, le potentiel DC est fixé à -275 mV de façon à sonder l'impédance du système. Dans tous les cas, l'amplificateur lock-in utilisé pour mesurer la eSPR va non seulement mesurer l'amplitude du signal alternatif, mais aussi sa phase. Selon le modèle du circuit équivalent, la phase de la sinusoïde est contrôlée par les deux condensateurs du système, C_{dl} la capacité double-couche, et C_{ads} la pseudo-capacitance associée à la monocouche de MB près de la surface. Le changement de conformation des interrupteurs va affecter C_{ads} et par le fait même la phase de la sinusoïde, ce qui permet de faire de la détection à partir de la phase eSPR.

La phase est généralement plus bruitée que le signal d'amplitude et est considérablement plus difficile à mesurer parce qu'il faut comparer la phase du signal réponse à celle du signal d'excitation. Ceci est illustré à la Figure 4.7 (a), où l'amplitude (noir) et la phase (rouge) du signal eSPR sont montrées en fonction du potentiel DC dans un voltammogramme AC (50 mV, 100 Hz). Loin du potentiel rédox, le signal SPR est si faible que l'amplificateur lock-in distingue mal la phase, ce qui résulte en un bruit élevé. À la Figure 4.7 (b), l'amplitude (noir) et la phase (rouge)

du signal eSPR en temps réel sont montrées pendant l'hybridation de 200 nM de Target_1. Si les dynamiques sont les mêmes, le signal de phase est beaucoup plus bruyant.

L'un des principaux avantages est que la phase n'est pas sensible à l'intensité de lumière utilisée, contrairement au signal d'amplitude, et devrait donner des résultats plus reproductibles d'un échantillon à l'autre.

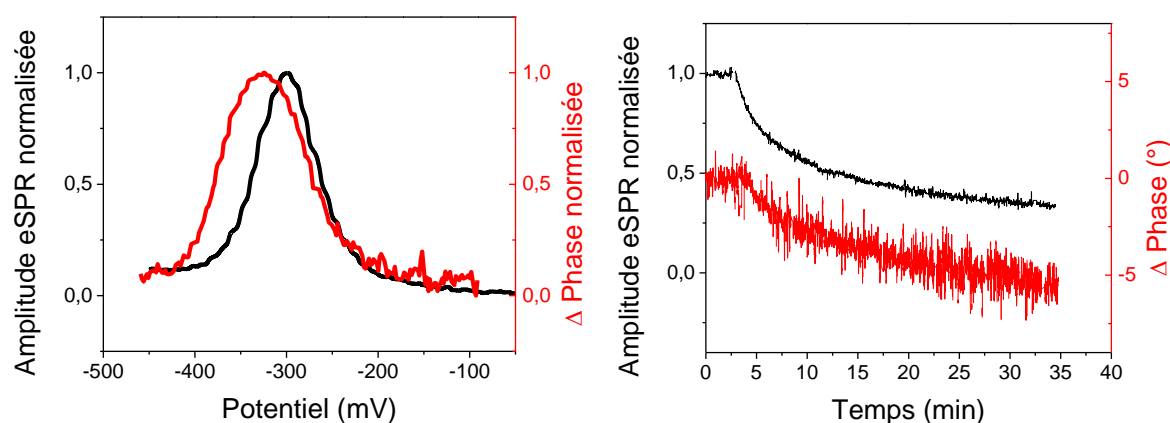


Figure 4.7 : Informations sur la phase eSPR. a) Amplitude et phase eSPR normalisées lors d'une mesure de voltampérométrie AC. b) Détection en temps réel avec l'amplitude et la phase.

4.3 Limites du système eSPR

4.3.1 Dépendance de l'angle d'interrogation et de la permittivité du milieu

La méthode eSPR alternative est basée sur le changement d'intensité engendré par le déplacement du pic SPR à un angle fixe. Par conséquent, pour un changement d'indice de réfraction qui engendre un déplacement "latéral" du pic SPR, l'amplitude du signal eSPR mesuré est directement proportionnelle à la différence d'intensité dérivée du pic SPR (Figure 4.8 a). La sensibilité eSPR maximale est obtenue à l'angle de la dérivée maximale, et la sensibilité minimale est obtenue à l'angle de résonance SPR. Rappelons que, tel que discuté dans l'article, le paramètre de calibration eSPR est important pour corriger la réponse mesurée lorsque l'indice de réfraction change de plus de 10^{-3} RIU à proximité de la surface.

L'intensité SPR et l'amplitude eSPR AC ont été mesurés expérimentalement en variant l'angle d'interrogation. Les résultats sont montrés à la Figure 4.8 (b). Si l'allure générale de la

courbe d'amplitude eSPR est similaire à celle prédite théoriquement, deux principales différences sont observées: le minimum de sensibilité est obtenu pour un angle plus faible que l'angle de résonance, et l'asymétrie des deux pics sensibles est accentuée.

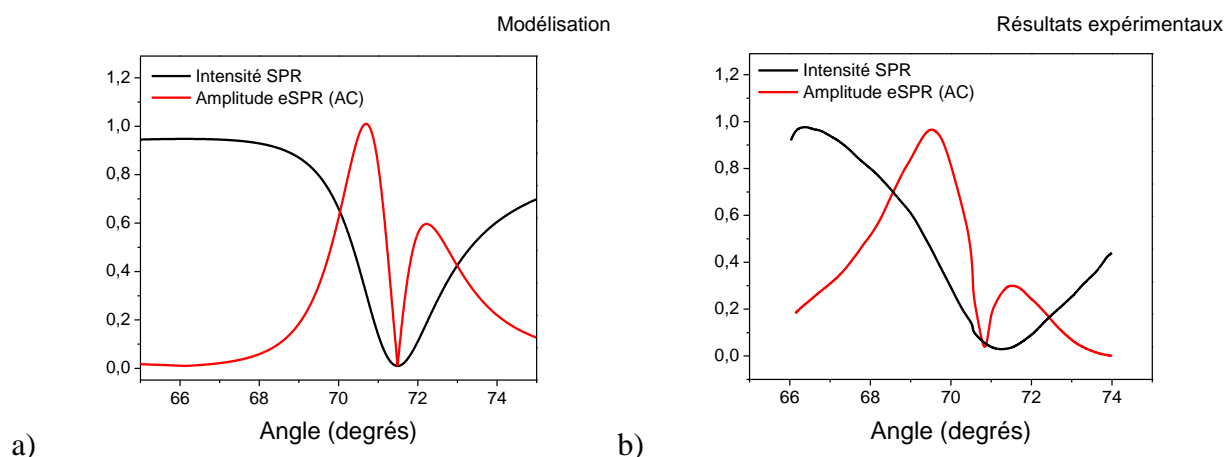


Figure 4.8 : Graphiques de l'intensité SPR et de l'amplitude eSPR en fonction de l'angle a) modélisé et b) obtenu expérimentalement.

À notre avis, ce phénomène peut être expliqué par la différence d'absorption entre MB_{ox} et MB_{red} . En effet, tel que vu à la section 2.2.4, la partie imaginaire de l'indice de réfraction κ influence la profondeur du pic, tandis que la partie réelle n influence sa position. La sensibilité du eSPR dépend donc des valeurs de κ et n du bleu de méthylène absorbé et réduit. Ces valeurs ne sont pas données dans la littérature, mais il est connu que l'absorption κ de MB_{ox} est plus élevée que celle de MB_{red} à 633 nm (Figure 2.19). Étudions les trois cas possibles du changement des propriétés optiques quand MB_{red} est oxydé vers MB_{ox} :

- 1 - κ augmente, n constant.
- 2 - κ augmente, n diminue.
- 3 - κ augmente, n augmente.

Les spectres d'amplitude eSPR dans ces trois cas ont été calculés et les résultats sont présentés à la Figure 4.9. Les valeurs de κ et n ont été variées de 10^{-3} par rapport aux valeurs initiales. Il est clair que le cas #2 est celui qui rejoint le mieux les résultats expérimentaux. De

plus, les résultats obtenus en voltampérométrie cyclique (voir l'Annexe 1) semblent confirmer que la partie réelle de l'indice de réfraction n diminue lorsque MB_{red} est oxydé vers MB_{ox} .

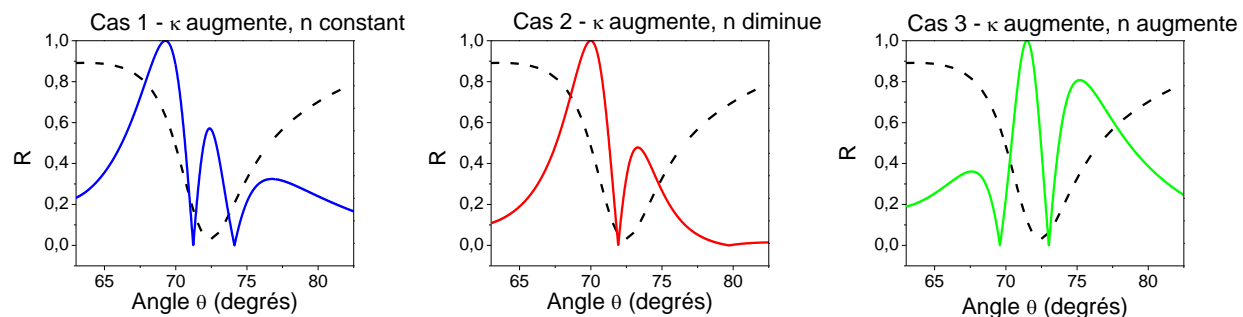


Figure 4.9 : Amplitude eSPR AC comparée au pic SPR en variant les paramètres κ et n du MB_{ox} .

Sommaire et discussion

Cette analyse préliminaire a montré que la dépendance entre l'angle d'incidence et le paramètre de calibration eSPR dépend des variations en n et κ entre la forme réduite et oxydé du marqueur optique utilisé. Dans le cas du bleu de méthylène à 633 nm où l'absorption de la forme oxydée est beaucoup plus élevée que celle de la forme réduite, le paramètre de calibration eSPR adopte une forme plus asymétrique que dans le cas d'une molécule dont seulement le n serait varié. Pour confirmer expérimentalement ce résultat, la mesure de la courbe eSPR de la Figure 4.8 (b) pourrait être répétée à une longueur d'onde hors du pic d'absorption du bleu de méthylène oxydé.

Il faut souligner que cette dépendance dépend de l'absorption du marqueur MB et non du milieu de test. Par conséquent, si les échantillons d'or sont toujours fonctionnalisés avec les mêmes E-ADN qui ont la même densité de fonctionnalisation, le paramètre de calibration est valide dans des milieux de différents indices de réfraction.

4.3.2 Influence de la force ionique

La force ionique est définie comme la concentration totale d'ions en solutions. Il existe plusieurs mécanismes par lesquels elle affecte les propriétés électrochimiques d'un système. Les plus flagrants sont la résistance de la solution et la capacité double-couche qui sont influencées par la concentration d'ions en solution. Tel qu'indiqué à la section 2.1.4, la capacité double-couche est directement reliée à l'amplitude du pic rédox en voltampérométrie AC, et une

augmentation de la force ionique devrait résulter en une diminution du pic. La force ionique peut également augmenter ou diminuer le taux de réduction ou d'oxydation en faisant l'écrantage des interactions électrostatiques entre l'élément donneur et l'électrode [69, 134]. Dans le cas des E-ADN, la force ionique affecte l'hybridation de l'ADN et la rigidité des structures d'ADN simple-brin et double-brin [132]. Il faut comprendre que les simple-brins d'ADN ont une faible charge négative et que, dans des solutions peu ioniques, ils ont tendance à se repousser, ce qui ralentit l'hybridation. Dans notre cas, l'interrupteur adopte initialement une structure tige-boucle qui dépend de l'auto-hybridation. S'il n'y a pas suffisamment d'ions, l'interrupteur sera complètement déplié à l'état initial, et le reporteur rédox sera loin de la surface. Lorsque la concentration ionique est augmentée, la charge de l'oligonucléotide est écrantée, et l'auto-hybridation peut avoir lieu, résultant en une structure tige-boucle de l'interrupteur qui maintient le reporteur rédox près de la surface. Ainsi, la structure générale des interrupteurs et, par conséquent, la distance moyenne du reporteur MB de la surface, est influencée par la force ionique de la solution tampon [68].

Caractérisation expérimentale

Cette influence a été évaluée expérimentalement sur les deux systèmes en faisant l'acquisition de voltammogrammes AC (100Hz, 50mV amplitude; 10mV/s, -100 à -450 mV) dans des échantillons de 5 mL de tampon phosphate salin (PBS) de concentrations variant sur trois ordres de grandeur, de 0.1XPBS à 10XPBS, équivalentes à des forces ioniques de 14 mM à 1.4 M.

Les voltammogrammes AC électrochimiques sont montrés à la Figure 4.10. Pour de très faibles concentrations ioniques (0XPBS et 0.1XPBS), le rapport entre l'amplitude du pic et le courant de fond est petit. En effet, lorsque la conductivité de la solution est trop faible, la résistance de la solution devient importante et masque le comportement rédox de l'échantillon mesuré par le potentiostat tel que le montre le circuit équivalent. En augmentant la concentration de PBS, l'amplitude du pic augmente et se déplace vers des potentiels plus positifs.

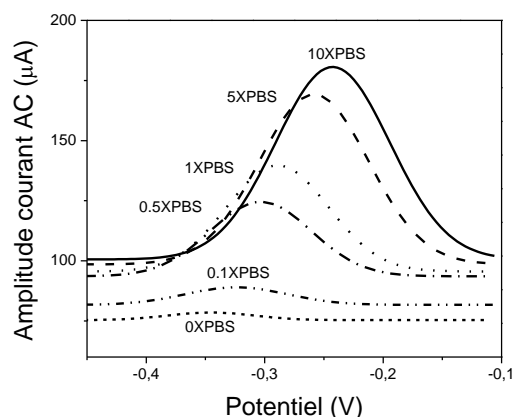


Figure 4.10 : Voltammogrammes AC électrochimiques pour une surface modifiée avec des interrupteurs immergée dans différentes concentrations de tampon phosphate salin.

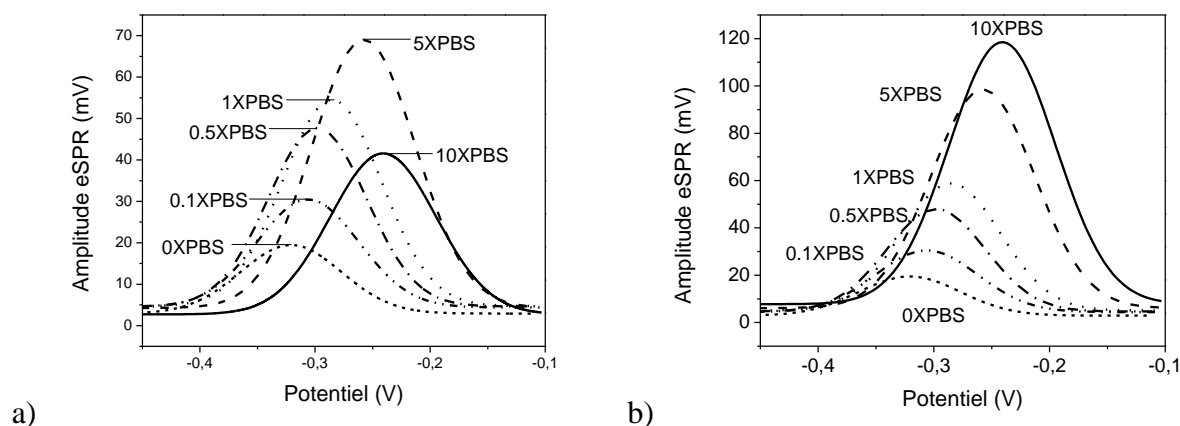


Figure 4.11 : a) Voltammogrammes AC plasmoniques pour une surface modifiée avec des interrupteurs immergée dans différentes concentrations de tampon phosphate salin. b) Voltammogrammes AC plasmoniques corrigées pour les variations d'indice de réfraction.

Les voltammogrammes AC plasmoniques sont montrés à la Figure 4.11. Contrairement aux résultats obtenus en électrochimie, il y a peu de variations dans la valeur de base d'une concentration à l'autre. Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'en eSPR, la résistance de la solution n'est pas mesurée et la sensibilité à la capacité double-couche est plus faible. De la même façon qu'en électrochimie, les pics se déplacent vers les potentiels plus positifs en augmentant la concentration de PBS. L'amplitude des pics augmente jusqu'à 5XPBS, et diminue par la suite. Cet effet peut-être expliqué par la différence d'indice de réfraction d'une concentration de PBS à

l'autre, qui influence l'amplitude du signal eSPR tel qu'expliqué dans la section 4.3.1. L'indice de réfraction du PBS (RI_{PBS}) est donné approximativement par la formule suivante [135], avec la concentration $x=1$ équivalent à 1XPBS, $x=5$ équivalent à 5XPBS, etc.

$$RI_{PBS} = 0.00164x + 1.33695 \quad (2.53)$$

Les facteurs de correction à utiliser pour chaque concentration de PBS sont résumés dans le Tableau 4.2. Une fois cette correction appliquée, l'amplitude et la position du pic de rédox sont corrélées en électrochimie et en plasmonique, tel que montré à la Figure 4.12 (a) et (b).

Tableau 4.2 : Variations d'indice de réfraction et facteurs de correction correspondants pour différentes concentrations de PBS.

Concentration de PBS	0XPBS	0.1XPBS	0.5XPBS	1XPBS	5XPBS	10XPBS
Variation de l'indice de réfraction ($\times 10^{-4}$ RIU)	0	1.64	8.20	16.4	82.0	164
Facteur de correction	1	1	0.996	0.983	0.701	0.351

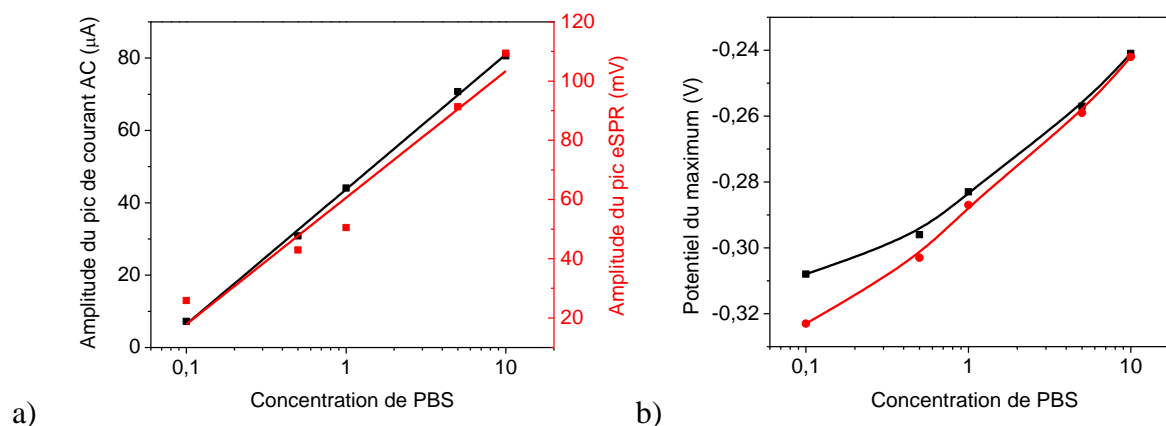


Figure 4.12 : a) Amplitude et b) potentiel des pics d'oxydo-réduction des voltammogrammes électrochimiques (noir) et plasmoniques (rouge). Les valeurs d'amplitude plasmoniques ont été corrigées par rapport au paramètre de calibration de l'indice de réfraction.

Sommaire et discussion

La force ionique influence à la fois l'amplitude et le potentiel du pic rédox et ces effets sont spécifiques à la réaction et non à la méthode de mesure. Les variations d'amplitude peuvent être expliquées au moins partiellement par les changements de structure des interrupteurs, mais vont à l'encontre de ce qui était attendu selon l'analyse du circuit équivalent. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de mécanisme spécifique aux E-ADN pour la variation du potentiel en fonction de la concentration ionique. Une hypothèse est qu'à faible concentration ionique, il y ait une interaction électrostatique entre le MB_{ox} (chargé positivement) et l'ADN (chargé négativement) qui ralentit la réaction à l'électrode. Ces interactions sont écrantées à de plus grandes concentrations ioniques [136]. Une autre hypothèse est que la présence d'ions en solutions facilite le transfert d'électrons par effet tunnel entre le reporteur bleu de méthylène et l'électrode. Si le mécanisme de ces variations n'est pas complètement compris, ces résultats soulignent toutefois l'importance d'utiliser des solutions de concentration ioniques similaires pour assurer la justesse des résultats, tel qu'il l'a été mentionné dans la littérature des E-ADN [64]. Une autre approche pourrait consister à utiliser un canal de référence qui pourrait corriger pour l'effet de la force ionique.

4.3.3 Correction du bruit et de la dérive du signal

Le bruit et la dérive du signal sont deux aspects critiques pour le développement d'un capteur. Le système eSPR développé fait une mesure en intensité à angle fixe de la courbe SPR et est par conséquent extrêmement sensible aux fluctuations de l'intensité de la source. Un exemple de cette dépendance au cours d'une mesure d'hybridation est montré à la Figure 4.13 (a), où l'amplitude de la sinusoïde eSPR est présentée en noir et l'intensité optique totale mesurée par le détecteur est montrée en rouge. Les deux signaux sont certainement corrélés, avec le signal eSPR qui montre des sauts d'amplitude en même temps que l'intensité optique.

Pour corriger cet effet, nous avons simplement divisé le signal eSPR par l'intensité optique, et ce pour tous les résultats montrés dans le mémoire. La courbe résultante dans cet exemple est montrée en noir dans la Figure 4.13 (b). Cette technique ne peut cependant pas être utilisée lorsqu'il y a un changement important ($>10^{-3}$ RIU) d'indice de réfraction du milieu, parce que la courbe SPR se déplace également, ce qui affecte l'intensité optique mesurée au détecteur.

Trois méthodes alternatives seraient possibles pour corriger de manière plus fiable cet effet dans un éventuel dispositif commercial: un traitement numérique des données, la comparaison avec un canal de référence, ou une normalisation par rapport à l'intensité optique qui n'est pas affectée par le déplacement du pic SPR et l'indice de réfraction, par exemple l'intensité mesurée directement à la source ou de la polarisation "s" qui est réfléchiée sur la surface d'or.

Comme la plupart des senseurs, la eSPR montre une dérive de signal dans le temps. Il y a d'une part une dérive du signal SPR, qui est attribuable aux variations de température et de pH et au mouvement des ions et de la couche d'oligonucléotides immobilisés à la surface. Nous avons également observé une dérive décroissante telle que celle de la Figure 4.13 (b) (noir) qui était beaucoup plus marquée lors des mesures en temps réel et lorsque l'intensité optique est augmentée. Nous croyons que cette dérive est attribuable au marqueur MB. D'une part, les phénomènes d'oxydo-réduction du MB ne sont pas réversibles indéfiniment, et l'excitation pour un temps prolongé peut résulter en une diminution de son activité rédox. D'autre part, puisque le MB est absorbant à 633 nm, il est possible qu'à haute intensité lumineuse, il absorbe suffisamment d'énergie pour que ses performances soient affectées. Ces deux hypothèses expliqueraient pourquoi le signal en temps réel est affecté tandis que celui en voltampérométrie AC, qui est mesuré seulement pour une courte période de temps, ne montre pas cette dérive décroissante.

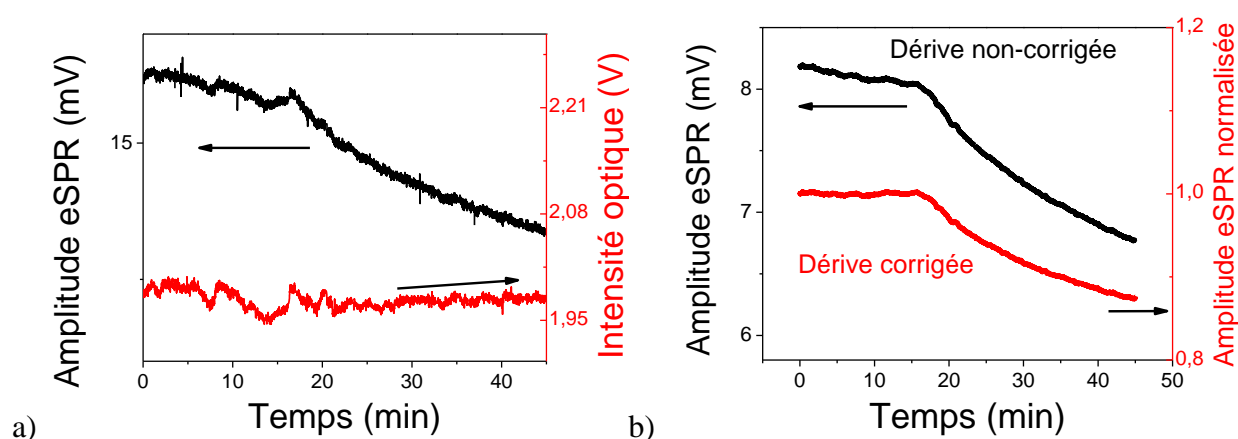


Figure 4.13 : Bruit et dérive du signal. a) Amplitude eSPR (noir) et intensité optique (rouge) mesurées. b) Exemple de correction pour la dérive du signal.

La dérive a été corrigée dans le mémoire en concordant la ligne de base avec une droite et en normalisant le signal par rapport à cette droite. Un exemple de la dérive corrigée est montré en rouge à la Figure 4.13 (b). Dans un dispositif commercial, il serait plus aisé de corriger la dérive par rapport à un canal de référence.

4.4 Discussion générale

L'objectif à long terme de ce projet est de développer un biocapteur qui offre une réponse sélective dans les milieux complexes et qui est pertinent pour des utilisations cliniques ou sur-le-terrain. Si nous avons démontré que la sélectivité de la méthode eSPR était effectivement accrue en comparaison avec la SPR conventionnelle, il reste essentiel de discuter du potentiel réel de cette technologie. Deux aspects seront brièvement discutés ici, soient la limite de détection et la portabilité du eSPR.

La limite de détection (LOD) de notre système eSPR est de 5 nM d'oligonucléotide à 21 bases, ce qui se compare à celle que nous avons obtenu précédemment sur le SPR angulaire en configuration Krestschmann (6 nM [20]). Nous sommes confiants que la LOD pourrait être diminuée de 1 à 2 ordres de grandeur en améliorant certains aspects du système, notamment en :

- Optimisant l'épaisseur de la couche d'or.
- Optimisant la longueur d'onde et l'angle d'interrogation de la lumière pour obtenir le maximum de contraste entre l'état oxydé et réduit du MB.
- Stabilisant la température.
- Utilisant un canal de référence pour corriger pour le bruit de la source.

Pour atteindre des LOD qui sont plus cliniquement pertinentes pour la détection d'oligonucléotides dans le sang, nous croyons que la méthode eSPR ne suffit pas. Il faudrait ajouter une étape d'amplification supplémentaire, par exemple en combinant avec un PCR sur puce pour multiplier la cible d'ADN présente dans l'échantillon.

Un deuxième aspect est la portabilité de l'appareil de bio-détection proposé. En effet, l'un des inconvénients du eSPR est que cette technologie nécessite à la fois de l'appareillage optique et électrochimique. Dans la configuration actuelle, les composantes volumineuses comprises dans la partie optique sont le laser, le prisme de couplage, le photo-détecteur/caméra et l'amplificateur lock-in, et celles comprises dans la partie électrochimique sont la contre-électrode, l'électrode de

référence et le potentiostat. Si la portabilité n'est pas le premier objectif de ce projet de recherche, il est important de considérer comment la technologie eSPR pourrait éventuellement être miniaturisée.

De nombreux travaux ont déjà été réalisés dans la littérature pour intégrer les biocapteurs SPR dans un format compact [137]. L'utilisation d'une fibre optique dont le bout est poli et couvert d'une mince couche d'or [138] ou d'une structure de guide d'onde multicouches [139] permettent d'éviter l'utilisation du prisme coupleur et d'intégrer des composantes optiques et optoélectroniques miniaturisés, mais diminuent la sensibilité d'environ 10-100 fois par rapport au SPR conventionnel en configuration Krestchmann. Les diodes électroluminescentes peuvent aussi être utilisées comme source lumineuse pour la SPR [140] et sont plus compactes et économiques que les lasers.

Le système de mesure électrochimique à trois électrodes peut facilement être transposé sur une seule puce de détection avec des méthodes de micro-fabrication. Un tel système a déjà été démontré en combinaison avec la livraison micro-fluidique et le PCR sur puce pour la détection des interrupteurs bio-électrochimiques [141].

CHAPITRE 5 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

5.1 Synthèse des travaux et principales contributions

Ce mémoire a d'abord introduit les lacunes en termes de sélectivité des méthodes de détection plasmoniques dans les milieux complexes qui limitent leur utilisation dans des contextes cliniques. Pour remédier à ce problème, une solution basée sur la combinaison d'interrupteurs bio-électrochimiques qui produisent la signalisation et d'un mode de transduction eSPR qui fait la détection sélective d'un marqueur optique a été proposée. Les bases théoriques de cette approche ont été établies et une revue de littérature a soulevé les avantages des deux approches combinées pour la bio-détection. L'article du Chapitre 3 a montré et discuté des principaux résultats expérimentaux qui supportent que cette approche est plus sélective que la simple SPR dans les milieux complexes, et qu'elle permet de faire la détection rapide d'oligonucléotides cibles. Finalement, des aspects méthodologiques et étapes de caractérisation complémentaires ont soulevé certaines des limites de la méthode eSPR qui devront être optimisées dans de futurs travaux. Ce qui nous amène à résumer les principales contributions de ce projet de recherche:

Un système de détection multiparamétrique a été développé et caractérisé pour faire la mesure simultanée des propriétés plasmoniques, électrochimiques et électro-plasmoniques à l'interface entre l'or et le diélectrique. Ce système a été utilisé pour confirmer que les variations d'indice de réfraction à proximité de la surface était corrélés à l'oxydoréduction du bleu de méthylène et aux changements de conformation des interrupteurs bio-électrochimiques. Ce système combiné a également été utilisé pour caractériser la densité de fonctionnalisation à la surface d'or et étudier l'effet de la concentration ionique sur les voltammogrammes mesurés.

Une approche de détection originale à sélectivité accrue basée sur la combinaison de la SPR électrochimique et des interrupteurs bio-électrochimiques a été développée et validée pour la détection de deux séquences d'oligonucléotides associées à *Mycobacterium tuberculosis* et à *E. coli*. Les limites de détection obtenues dans une solution tampon sont de 5 nM et 10 nM respectivement, avec 50% de la réponse obtenue aux concentrations $C_{50\%}$ de 95 et 320 nM. La constante de temps τ est d'environ 11.5 minutes, ce qui signifie que le test de bio-détection peut

être effectué dans un intervalle de temps de l'ordre de la dizaine de minutes. Des résultats préliminaires ont montré que les signaux mesurés dans une solution tampon et dans le sang bovin correspondaient en termes de réponse et de cinétique d'hybridation, indiquant que la méthode est peu susceptible aux interactions non-spécifiques.

Des puces de détection et un protocole de test qui montrent plusieurs avantages pour la détection délocalisée ont été développés. Les résultats préliminaires ont confirmé que la méthode eSPR est apte à faire la multi-détection sur une même électrode grâce à la résolution spatiale du SPR. Les puces de test fonctionnalisées avec les interrupteurs bio-électrochimiques sont régénérables avec un nettoyage à l'urée et permettent d'effectuer plus de cinq tests sur une même surface de détection. Le protocole de test utilisé ne nécessite pas d'ajout de réactifs.

5.2 Limites de l'approche

L'approche eSPR développée est en quelque sorte une adaptation de la détection des interrupteurs bio-électrochimiques sur une plateforme plasmonique. La revue de littérature a souligné que la méthode eSPR, comme les méthodes électrochimiques, est sensible à la capacité double-couche et donc à la concentration ionique du milieu et aux espèces adsorbées non-spécifiquement à la surface. Si la stratégie de mesure de voltampérométrie AC permet de discriminer les effets spécifiques et non-spécifiques de la capacité double-couche autant en électrochimie qu'en eSPR, il reste néanmoins que la méthode eSPR peut difficilement être plus sélective que la méthode électrochimique. Elle sera également affectée par la présence de contaminants électro-actifs et par la concentration ionique de la solution de test, tel qu'il a été montré dans les résultats complémentaires.

L'approche eSPR est aussi sensible aux variations de plus de 10^{-3} RIU dans l'indice de réfraction du milieu. Il faut cependant ajouter que cette sensibilité affecte beaucoup moins la sélectivité qu'en SPR conventionnelle. En effet, en SPR conventionnelle, il n'y a pas de moyen simple de discriminer entre les changements d'indice de réfraction qui sont causés par l'attachement de la cible et ceux qui sont causés par le milieu de test. En eSPR, l'amplitude du signal alternatif peut être corrigée à partir du paramètre de calibration eSPR, qui peut être retrouvé indépendamment. Notons qu'une analyse préliminaire a déterminé que le paramètre de

calibration doit être ajusté en fonction des propriétés d'absorption du marqueur optique, ce qui n'a pas été considéré pour l'analyse des résultats dans ce travail.

Comme la grande majorité des capteurs, la eSPR est affectée par le bruit de la source et par la dérive du signal. Ces influences ont été corrigées dans ce travail en normalisant par l'intensité du signal optique et en faisant un post-traitement des données. Dans un biocapteur, ces effets devraient être corrigés par des méthodes plus pratiques et robustes, par exemple par la comparaison avec un canal de référence.

5.3 Recommandations et perspectives

Bien que la méthode eSPR combinée aux interrupteurs bio-électrochimiques se soit montrée suffisamment sélective pour faire la détection dans du sang bovin, il serait recommandé d'intégrer un canal de référence dans le dispositif pour éliminer les effets de la concentration ionique, de l'indice de réfraction du milieu, du bruit de la source et de la dérive du signal. La combinaison avec d'autres méthodes pour contrer l'adsorption non-spécifique, par exemple un filtrage à flux tangentiel, pourrait également être considéré.

Il a été mentionné à quelques reprises que la différence d'absorption entre l'état oxydé et réduit du bleu de méthylène affectait l'analyse des données, surtout en ce qui a trait au paramètre de calibration eSPR. Cet effet n'a pas été caractérisé formellement dans le mémoire, mais aurait avantage à être traité. Il n'est pas clair pour l'instant si le choix d'une molécule absorbante améliore le signal eSPR ou s'il en complique l'interprétation. Des études futures pourraient déterminer s'il est préférable de travailler avec un marqueur dont l'absorption ou l'indice de réfraction change pendant son oxydoréduction.

Si des résultats préliminaires pour la multi-détection et la détection dans le sang bovin ont été montrés, il faut envisager de produire des courbes d'étalonnage complètes dans chacune de ces conditions. Il reste aussi à valider la méthode dans des échantillons de patients où le ligand est présent en quantité inconnue.

Finalement, l'une des perspectives les plus intéressantes est la combinaison de cette approche avec une plateforme d'imagerie SPR pour faire la multi-détection à haut débit, où plusieurs taches sensibles sont présentes sur une même électrode. Pour y arriver, il faut

développer une méthode de fonctionnalisation de la surface suffisamment précise pour obtenir des taches d'environ 1 mm^2 dans un premier prototype. Pour un système d'imagerie pouvant être re-calibré, une plateforme nanoplasmonique en transmission est plus intéressante en raison de l'absence de prisme coupleur, et des tests performés dans nos laboratoires ont déjà montrés la combinaison des interrupteurs bio-électrochimiques avec un échantillon de nano-trous.

RÉFÉRENCES

- [1] A. P. F. Turner, "Biosensors: sense and sensibility", *Chemical Society Reviews*, vol. 42, pp. 3184-3196, 2013.
- [2] S. Buluswar, Z. Friedman, P. Mehta, S. Mitra, et R. Sathre, "50 Breakthroughs: Critical scientific and technological advances needed for sustainable global development," Institute for Globally Transformative Technologies, Lawrence Berkeley National Lab, Berkeley, California 2014.
- [3] P. Yanez-Sedeno, L. Agui, R. Villalonga, et J. M. Pingarron, "Biosensors in forensic analysis. A review", *Analytica Chimica Acta*, vol. 823, pp. 1-19, 2014.
- [4] R. O'Kennedy, P. Leonard, S. Hearty, S. Daly, P. Dillon, J. Brennan, *et al.*, "Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water", *Rapid Methods: For Biological and Chemical Contaminants in Food and Feed*, pp. 85-104, 2005.
- [5] M. N. Velasco-Garcia et T. Mottram, "Biosensor technology addressing agricultural problems", *Biosystems Engineering*, vol. 84, pp. 1-12, 2003.
- [6] J. S. Van Dyk et B. Pletschke, "Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment", *Chemosphere*, vol. 82, pp. 291-307, 2011.
- [7] I. Global Industry Analysts, "Biosensors - A Global Strategic Business Report," San Jose, CA2014.
- [8] L. C. Clark et C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery", *Annals of the New York Academy of sciences*, vol. 102, pp. 29-45, 1962.
- [9] J. Kirsch, C. Siltanen, Q. Zhou, A. Revzin, et A. Simonian, "Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine", *Chemical Society Reviews*, vol. 42, pp. 8733-8768, 2013.
- [10] C. Nylander, B. Liedberg, et T. Lind, "Gas detection by means of surface plasmon resonance", *Sensors and Actuators*, vol. 3, pp. 79-88, 1983.
- [11] J. Homola, "Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species", *Chemical Reviews*, vol. 108, pp. 462-493, 2008.
- [12] T. Springer, M. Piliarik, et J. Homola, "Real-time monitoring of biomolecular interactions in blood plasma using a surface plasmon resonance biosensor", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 398, pp. 1955-1961, 2010.
- [13] M. A. Arugula et A. Simonian, "Novel trends in affinity biosensors: current challenges and perspectives", *Measurement Science & Technology*, vol. 25, 2014.
- [14] H. K. Hunt et A. M. Armani, "Label-free biological and chemical sensors", *Nanoscale*, vol. 2, pp. 1544-1559, 2010.
- [15] G. S. Wilson et Y. B. Hu, "Enzyme based biosensors for in vivo measurements", *Chemical Reviews*, vol. 100, pp. 2693-2704, 2000.

- [16] S. Park, H. Boo, et T. D. Chung, "Electrochemical non-enzymatic glucose sensors", *Analytica Chimica Acta*, vol. 556, pp. 46-57, 2006.
- [17] K. R. Rogers, "Principles of affinity-based biosensors", *Molecular Biotechnology*, vol. 14, pp. 109-129, 2000.
- [18] K. Hegnerova, M. Bockova, H. Vaisocherova, Z. Kristofikova, J. Ricny, D. Ripova, *et al.*, "Surface plasmon resonance biosensors for detection of Alzheimer disease biomarker", *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 139, pp. 69-73, 2009.
- [19] H. Vaisocherova, K. Mrkvova, M. Pilarik, P. Jinoch, M. Steinbachova, et J. Homola, "Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibody against Epstein-Barr virus", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 22, pp. 1020-1026, 2007.
- [20] A. M. Dallaire, D. Rioux, A. Rachkov, S. Patskovsky, et M. Meunier, "Laser-Generated Au-Ag Nanoparticles For Plasmonic Nucleic Acid Sensing", *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 116, pp. 11370-11377, 2012.
- [21] S. Patskovsky, V. Latendresse, A. M. Dallaire, L. Dore-Mathieu, et M. Meunier, "Combined surface plasmon resonance and impedance spectroscopy systems for biosensing", *Analyst*, vol. 139, pp. 596-602, 2014.
- [22] J. S. Daniels et N. Pourmand, "Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges", *Electroanalysis*, vol. 19, pp. 1239-1257, 2007.
- [23] M. Liss, B. Petersen, H. Wolf, et E. Prohaska, "An aptamer-based quartz crystal protein biosensor", *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 4488-4495, 2002.
- [24] J. Homola, "Present and future of surface plasmon resonance biosensors", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 377, pp. 528-539, 2003.
- [25] F. Vollmer, D. Braun, A. Libchaber, M. Khoshshima, I. Teraoka, et S. Arnold, "Protein detection by optical shift of a resonant microcavity", *Applied Physics Letters*, vol. 80, pp. 4057-4059, 2002.
- [26] K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. N. Li, et V. M. Rotello, "Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing", *Chemical Reviews*, vol. 112, pp. 2739-2779, 2012.
- [27] J. Homola, S. S. Yee, et G. Gauglitz, "Surface plasmon resonance sensors: review", *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 54, pp. 3-15, 1999.
- [28] K. W. Plaxco et H. T. Soh, "Switch-based biosensors: a new approach towards real-time, in vivo molecular detection", *Trends in Biotechnology*, vol. 29, pp. 1-5, 2011.
- [29] D. A. Giljohann et C. A. Mirkin, "Drivers of biodiagnostic development", *Nature*, vol. 462, pp. 461-464, 2009.
- [30] X. L. Luo et J. J. Davis, "Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers", *Chemical Society Reviews*, vol. 42, pp. 5944-5962, 2013.
- [31] S. Choi et J. Chae, "Methods of reducing non-specific adsorption in microfluidic biosensors", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 20, 2010.
- [32] J. Ladd, Z. Zhang, S. Chen, J. C. Hower, et S. Jiang, "Zwitterionic polymers exhibiting high resistance to nonspecific protein adsorption from human serum and plasma", *Biomacromolecules*, vol. 9, pp. 1357-1361, 2008.

- [33] N. D. Brault, C. L. Gao, H. Xue, M. Piliarik, J. Homola, S. Y. Jiang, *et al.*, "Ultra-low fouling and functionalizable zwitterionic coatings grafted onto SiO₂ via a biomimetic adhesive group for sensing and detection in complex media", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 25, pp. 2276-2282, 2010.
- [34] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, et G. M. Whitesides, "A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein", *Langmuir*, vol. 17, pp. 5605-5620, 2001.
- [35] O. R. Bolduc, J. N. Pelletier, et J. F. Masson, "SPR Biosensing in Crude Serum Using Ultralow Fouling Binary Patterned Peptide SAM", *Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 3699-3706, 2010.
- [36] A. R. Statz, R. J. Meagher, A. E. Barron, et P. B. Messersmith, "New peptidomimetic polymers for antifouling surfaces", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, pp. 7972-7973, 2005.
- [37] V. Silin, H. Weetall, et D. J. Vanderah, "SPR studies of the nonspecific adsorption kinetics of human IgG and BSA on gold surfaces modified by self-assembled monolayers (SAMs)", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 185, pp. 94-103, 1997.
- [38] T. Springer, M. Bockova, et J. Homola, "Label-Free Biosensing in Complex Media: A Referencing Approach", *Analytical Chemistry*, vol. 85, pp. 5637-5640, 2013.
- [39] S. Kim, J. Lee, S. J. Lee, et H. J. Lee, "Ultra-sensitive detection of IgE using biofunctionalized nanoparticle-enhanced SPR", *Talanta*, vol. 81, pp. 1755-1759, 2010.
- [40] J. L. Wang, Z. Z. Zhu, A. Munir, et H. S. Zhou, "Fe(3)O(4) nanoparticles-enhanced SPR sensing for ultrasensitive sandwich bio-assay", *Talanta*, vol. 84, pp. 783-788, 2011.
- [41] L. M. Bonanno et L. A. DeLouise, "Whole blood optical biosensor", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 23, pp. 444-448, 2007.
- [42] G. J. Zhang, Z. H. H. Luo, M. J. Huang, J. J. Ang, T. G. Kang, et H. M. Ji, "An integrated chip for rapid, sensitive, and multiplexed detection of cardiac biomarkers from fingerprick blood", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 28, pp. 459-463, 2011.
- [43] B. S. Ferguson, D. A. Hoggarth, D. Maliniak, K. Ploense, R. J. White, N. Woodward, *et al.*, "Real-Time, Aptamer-Based Tracking of Circulating Therapeutic Agents in Living Animals", *Science Translational Medicine*, vol. 5, 2013.
- [44] N. Pamme, "Continuous flow separations in microfluidic devices", *Lab on a Chip*, vol. 7, pp. 1644-1659, 2007.
- [45] E. Stern, A. Vacic, N. K. Rajan, J. M. Criscione, J. Park, B. R. Ilic, *et al.*, "Label-free biomarker detection from whole blood", *Nature Nanotechnology*, vol. 5, pp. 138-142, 2010.
- [46] C. H. Fan, K. W. Plaxco, et A. J. Heeger, "Biosensors based on binding-modulated donor-acceptor distances", *Trends in Biotechnology*, vol. 23, pp. 186-192, 2005.
- [47] C. H. Fan, K. W. Plaxco, et A. J. Heeger, "Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, pp. 9134-9137, 2003.

- [48] S. Tyagi et F. R. Kramer, "Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization", *Nature Biotechnology*, vol. 14, pp. 303-308, 1996.
- [49] Y. Xiao, A. A. Lubin, A. J. Heeger, et K. W. Plaxco, "Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor", *Angewandte Chemie-International Edition*, vol. 44, pp. 5456-5459, 2005.
- [50] Y. Xiao, A. A. Rowe, K. W. Plaxco, et A. J. Heeger, "Electrochemical detection of parts per billion lead via an electrode-bound DNzyme assembly", *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, vol. 233, pp. 449-449, 2007.
- [51] A. D. Ellington et J. W. Szostak, "Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures", 1992.
- [52] C. E. Immoos et M. W. Grinstaff, "Conformationally-gated electrochemical gene detection: The hairpin and wrap assays.", *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, vol. 228, pp. U891-U892, 2004.
- [53] F. Ricci et K. W. Plaxco, "E-DNA sensors for convenient, label-free electrochemical detection of hybridization", *Microchimica Acta*, vol. 163, pp. 149-155, 2008.
- [54] A. A. Lubin, R. Y. Lai, B. R. Baker, A. J. Heeger, et K. W. Plaxco, "Sequence-specific, electronic detection of oligonucleotides in blood, soil, and foodstuffs with the reagentless, reusable E-DNA sensor", *Analytical Chemistry*, vol. 78, pp. 5671-5677, 2006.
- [55] Y. Xiao, B. D. Piorek, K. W. Plaxco, et A. J. Heeger, "A reagentless signal-on architecture for electronic, aptamer-based sensors via target-induced strand displacement", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, pp. 17990-17991, 2005.
- [56] R. Y. Lai, K. W. Plaxco, et A. J. Heeger, "Aptamer-based electrochemical detection of picomolar platelet-derived growth factor directly in blood serum", *Analytical Chemistry*, vol. 79, pp. 229-233, 2007.
- [57] A. Vallee-Belisle, F. Ricci, T. Uzawa, F. Xia, et K. W. Plaxco, "Bioelectrochemical Switches for the Quantitative Detection of Antibodies Directly in Whole Blood", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, pp. 15197-15200, 2012.
- [58] R. J. White, A. A. Rowe, et K. W. Plaxco, "Re-engineering aptamers to support reagentless, self-reporting electrochemical sensors", *Analyst*, vol. 135, pp. 589-594, 2010.
- [59] A. E. Radi et C. K. O'Sullivan, "Aptamer conformational switch as sensitive electrochemical biosensor for potassium ion recognition", *Chemical Communications*, pp. 3432-3434, 2006.
- [60] B. R. Baker, R. Y. Lai, M. S. Wood, E. H. Doctor, A. J. Heeger, et K. W. Plaxco, "An electronic, aptamer-based small-molecule sensor for the rapid, label-free detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, pp. 3138-3139, 2006.
- [61] A. A. Rowe, E. A. Miller, et K. W. Plaxco, "Reagentless measurement of aminoglycoside antibiotics in blood serum via an electrochemical, ribonucleic acid aptamer-based biosensor", *Analytical chemistry*, vol. 82, pp. 7090-7095, 2010.

- [62] E. E. Ferapontova, E. M. Olsen, et K. V. Gothelf, "An RNA aptamer-based electrochemical biosensor for detection of theophylline in serum", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, pp. 4256-+, 2008.
- [63] A. A. Rowe, R. J. White, A. J. Bonham, et K. W. Plaxco, "Fabrication of Electrochemical-DNA Biosensors for the Reagentless Detection of Nucleic Acids, Proteins and Small Molecules", *Journal of Visualized Experiments*, vol. 52, p. 2922, 2011.
- [64] Y. Xiao, R. Y. Lai, et K. W. Plaxco, "Preparation of electrode-immobilized, redox-modified oligonucleotides for electrochemical DNA and aptamer-based sensing", *Nature protocols*, vol. 2, pp. 2875-2880, 2007.
- [65] D. M. Jenkins, B. Chami, M. Kreuzer, G. Presting, A. M. Alvarez, et B. Y. Liaw, "Hybridization probe for femtomolar quantification of selected nucleic acid sequences on a disposable electrode", *Analytical Chemistry*, vol. 78, pp. 2314-2318, 2006.
- [66] A. L. Eckermann, D. J. Feld, J. A. Shaw, et T. J. Meade, "Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers", *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 254, pp. 1769-1802, 2010.
- [67] D. M. de Rooij, "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications", *Anti-Corrosion Methods and Materials*, vol. 50, 2003.
- [68] T. Uzawa, R. R. Cheng, R. J. White, D. E. Makarov, et K. W. Plaxco, "A Mechanistic Study of Electron Transfer from the Distal Termini of Electrode-Bound, Single-Stranded DNAs", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, pp. 16120-16126, 2010.
- [69] D. M. Adams, L. Brus, C. E. D. Chidsey, S. Creager, C. Creutz, C. R. Kagan, *et al.*, "Charge transfer on the nanoscale: Current status", *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, pp. 6668-6697, 2003.
- [70] G. I. Likhtenshtein, *Solar Energy Conversion: Chemical Aspects*: John Wiley & Sons, 2012.
- [71] P. Kissinger et W. R. Heineman, *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, revised and expanded*: CRC press, 1996.
- [72] J. J. Sumner, K. S. Weber, L. A. Hockett, et S. E. Creager, "Long-range heterogeneous electron transfer between ferrocene and gold mediated by n-alkane and N-alkyl-carboxamide bridges", *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 104, pp. 7449-7454, 2000.
- [73] S. E. Creager et T. T. Wooster, "A new way of using ac voltammetry to study redox kinetics in electroactive monolayers", *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 4257-4263, 1998.
- [74] F. Ricci, R. Y. Lai, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, et J. J. Sumner, "Effect of molecular crowding on the response of an electrochemical DNA sensor", *Langmuir*, vol. 23, pp. 6827-6834, 2007.
- [75] R. Y. Lai, D. S. Seferos, A. J. Heeger, G. C. Bazan, et K. W. Plaxco, "Comparison of the signaling and stability of electrochemical DNA sensors fabricated from 6-or 11-carbon self-assembled monolayers", *Langmuir*, vol. 22, pp. 10796-10800, 2006.

- [76] D. Kang, X. L. Zuo, R. Q. Yang, F. Xia, K. W. Plaxco, et R. J. White, "Comparing the Properties of Electrochemical-Based DNA Sensors Employing Different Redox Tags", *Analytical Chemistry*, vol. 81, pp. 9109-9113, 2009.
- [77] E. Kretschmann et H. Raether, "Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light", *Z. Naturforsch. a*, vol. 23, pp. 2135-2136, 1968.
- [78] A. P. Blanchard-Dionne, L. Guyot, S. Patskovsky, R. Gordon, et M. Meunier, "Intensity based surface plasmon resonance sensor using a nanohole rectangular array", *Optics Express*, vol. 19, pp. 15041-15046, 2011.
- [79] A. B. Dahlin, B. Dielacher, P. Rajendran, K. Sugihara, T. Sannomiya, M. Zenobi-Wong, et al., "Electrochemical plasmonic sensors", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 402, pp. 1773-1784, 2012.
- [80] J. M. Pitarke, V. M. Silkin, E. V. Chulkov, et P. M. Echenique, "Theory of surface plasmons and surface-plasmon polaritons", *Reports on Progress in Physics*, vol. 70, pp. 1-87, 2007.
- [81] S. A. Maier, *Plasmonics: fundamentals and applications: fundamentals and applications*: Springer Science & Business Media, 2007.
- [82] J. Homola, *Surface plasmon resonance based sensors* vol. 4: Springer Science & Business Media, 2006.
- [83] P. B. Johnson et R.-W. Christy, "Optical constants of the noble metals", *Physical Review B*, vol. 6, p. 4370, 1972.
- [84] K. Murata et H. Tanaka, "Surface-wetting effects on the liquid-liquid transition of a single-component molecular liquid", *Nature Communications*, vol. 1, 2010.
- [85] K. Kurihara et K. Suzuki, "Theoretical understanding of an absorption-based surface plasmon resonance sensor based on Kretschmann's theory", *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 696-701, 2002.
- [86] W. Chen et J. Chen, "Use of surface plasma waves for determination of the thickness and optical constants of thin metallic films", *JOSA*, vol. 71, pp. 189-191, 1981.
- [87] S. Mowry et P. J. Ogren, "Kinetics of methylene blue reduction by ascorbic acid", *Journal of chemical education*, vol. 76, p. 970, 1999.
- [88] S. Prahl et S. L. Jacques. (2014, 3 mars). *Optical absorption of Methylene Blue*. Available: <http://omlc.org/spectra/mb/>
- [89] S. P. Wang, X. P. Huang, X. N. Shan, K. J. Foley, et N. J. Tao, "Electrochemical Surface Plasmon Resonance: Basic Formalism and Experimental Validation", *Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 935-941, 2010.
- [90] C. S. Moreira, A. M. N. Lima, H. Neff, et C. Thirstrup, "Temperature-dependent sensitivity of surface plasmon resonance sensors at the gold-water interface", *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 134, pp. 854-862, 2008.
- [91] K. J. Foley, X. Shan, et N. J. Tao, "Surface impedance imaging technique", *Analytical Chemistry*, vol. 80, pp. 5146-5151, 2008.

- [92] A. Baba, M. K. Park, R. C. Advincula, et W. Knoll, "Simultaneous surface plasmon optical and electrochemical investigation of layer-by-layer self-assembled conducting ultrathin polymer films", *Langmuir*, vol. 18, pp. 4648-4652, 2002.
- [93] X. F. Kang, Y. D. Jin, G. J. Cheng, et S. J. Dong, "In situ analysis of electropolymerization of aniline by combined electrochemistry and surface plasmon resonance", *Langmuir*, vol. 18, pp. 1713-1718, 2002.
- [94] A. Baba, S. J. Tian, F. Stefani, C. J. Xia, Z. H. Wang, R. C. Advincula, *et al.*, "Electropolymerization and doping/dedoping properties of polyaniline thin films as studied by electrochemical-surface plasmon spectroscopy and by the quartz crystal microbalance", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 562, pp. 95-103, 2004.
- [95] S. Szunerits, Y. Coffinier, S. Janel, et R. Boukherroub, "Stability of the gold/silica thin film interface: Electrochemical and surface plasmon resonance studies", *Langmuir*, vol. 22, pp. 10716-10722, 2006.
- [96] S. Szunerits et R. Boukherroub, "Electrochemical investigation of gold/silica thin film interfaces for electrochemical surface plasmon resonance studies", *Electrochemistry Communications*, vol. 8, pp. 439-444, 2006.
- [97] Y. Iwasaki, T. Horiuchi, et O. Niwa, "Detection of electrochemical enzymatic reactions by surface plasmon resonance measurement", *Analytical Chemistry*, vol. 73, pp. 1595-1598, 2001.
- [98] X. F. Kang, G. J. Cheng, et S. J. Dong, "A novel electrochemical SPR biosensor", *Electrochemistry Communications*, vol. 3, pp. 489-493, 2001.
- [99] S. Sriwichai, A. Baba, S. Phanichphant, K. Shinbo, K. Kato, et F. Kaneko, "Electrochemically controlled surface plasmon resonance immunosensor for the detection of human immunoglobulin G on poly(3-aminobenzoic acid) ultrathin films", *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 147, pp. 322-329, 2010.
- [100] K. Nakamoto, R. Kurita, et O. Niwa, "One-chip biosensor for simultaneous disease marker/calibration substance measurement in human urine by electrochemical surface plasmon resonance method", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 26, pp. 1536-1542, 2010.
- [101] R. J. Heaton, A. W. Peterson, et R. M. Georgiadis, "Electrostatic surface plasmon resonance: Direct electric field-induced hybridization and denaturation in monolayer nucleic acid films and label-free discrimination of base mismatches", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, pp. 3701-3704, 2001.
- [102] J. L. Wang, F. Wang, X. Q. Zou, Z. A. Xu, et S. J. Dong, "Surface plasmon resonance and electrochemistry for detection of small molecules using catalyzed deposition of metal ions on gold substrate", *Electrochemistry Communications*, vol. 9, pp. 343-347, 2007.
- [103] L. Ferrari, H. Sipova, I. Tichy, K. Chadt, et J. Homola, "Electrochemical surface plasmon resonance biosensor for study of DNA desorption and hybridization", *Optical Sensors 2013*, vol. 8774, 2013.

- [104] Y. Iwasaki, T. Horiuchi, M. Morita, et O. Niwa, "Analysis of electrochemical processes using surface plasmon resonance", *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 50, pp. 145-148, 1998.
- [105] S. Scarano, M. Mascini, A. P. F. Turner, et M. Minunni, "Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 25, pp. 957-966, 2010.
- [106] O. Andersson, C. Ulrich, F. Bjorefors, et B. Liedberg, "Imaging SPR for detection of local electrochemical processes on patterned surfaces", *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 134, pp. 545-550, 2008.
- [107] X. N. Shan, S. P. Wang, W. Wang, et N. J. Tao, "Plasmonic-Based Imaging of Local Square Wave Voltammetry", *Analytical Chemistry*, vol. 83, pp. 7394-7399, 2011.
- [108] X. N. Shan, I. Diez-Perez, L. J. Wang, P. Wiktor, Y. Gu, L. H. Zhang, *et al.*, "Imaging the electrocatalytic activity of single nanoparticles", *Nature Nanotechnology*, vol. 7, pp. 668-672, 2012.
- [109] W. Wang, K. Foley, X. Shan, S. P. Wang, S. Eaton, V. J. Nagaraj, *et al.*, "Single cells and intracellular processes studied by a plasmonic-based electrochemical impedance microscopy", *Nature Chemistry*, vol. 3, pp. 249-255, 2011.
- [110] J. Lu, W. Wang, S. P. Wang, X. N. Shan, J. H. Li, et N. J. Tao, "Plasmonic-Based Electrochemical Impedance Spectroscopy: Application to Molecular Binding", *Analytical Chemistry*, vol. 84, pp. 327-333, 2012.
- [111] W. B. Liang, S. P. Wang, F. Festa, P. Wiktor, W. Wang, M. Magee, *et al.*, "Measurement of Small Molecule Binding Kinetics on a Protein Microarray by Plasmonic-Based Electrochemical Impedance Imaging", *Analytical Chemistry*, vol. 86, pp. 9860-9865, 2014.
- [112] C. MacGriff, S. P. Wang, P. Wiktor, W. Wang, X. N. Shan, et N. J. Tao, "Charge-Based Detection of Small Molecules by Plasmonic-Based Electrochemical Impedance Microscopy", *Analytical Chemistry*, vol. 85, pp. 6682-6687, 2013.
- [113] X. N. Shan, U. Patel, S. P. Wang, R. Iglesias, et N. J. Tao, "Imaging Local Electrochemical Current via Surface Plasmon Resonance", *Science*, vol. 327, pp. 1363-1366, 2010.
- [114] N. L. Rosi et C. A. Mirkin, "Nanostructures in biodiagnostics", *Chemical Reviews*, vol. 105, pp. 1547-1562, 2005.
- [115] E. Reimhult, C. Larsson, B. Kasemo, et F. Hook, "Simultaneous surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance with dissipation monitoring measurements of biomolecular adsorption events involving structural transformations and variations in coupled water", *Analytical Chemistry*, vol. 76, pp. 7211-7220, 2004.
- [116] A. Barik, L. M. Otto, D. Yoo, J. Jose, T. W. Johnson, et S. H. Oh, "Dielectrophoresis-Enhanced Plasmonic Sensing with Gold Nanohole Arrays", *Nano Letters*, vol. 14, pp. 2006-2012, 2014.
- [117] T. Sannomiya, H. Dermutz, C. Hafner, J. Voros, et A. B. Dahlin, "Electrochemistry on a Localized Surface Plasmon Resonance Sensor", *Langmuir*, vol. 26, pp. 7619-7626, 2010.

- [118] R. Koetz, D. M. Kolb, et J. K. Sass, "Electron density effects in surface plasmon excitation on silver and gold electrodes", *Surface Science*, vol. 69, pp. 359-364, 1977.
- [119] J. G. Gordon et S. Ernst, "Surface plasmons as a probe of the electrochemical interface", *Surface Science*, vol. 101, pp. 499-506, 1980.
- [120] A. B. Dahlin, R. Zahn, et J. Voros, "Nanoplasmonic sensing of metal-halide complex formation and the electric double layer capacitor", *Nanoscale*, vol. 4, pp. 2339-2351, 2012.
- [121] A. J. Wain, H. N. L. Do, H. S. Mandal, H. B. Kraatz, et F. M. Zhou, "Influence of molecular dipole moment on the redox-induced reorganization of alpha-helical peptide self-assembled monolayers: An electrochemical SPR investigation", *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 112, pp. 14513-14519, 2008.
- [122] K. Nakamoto, R. Kurita, et O. Niwa, "Electrochemical Surface Plasmon Resonance Measurement Based on Gold Nanohole Array Fabricated by Nanoimprinting Technique", *Analytical Chemistry*, vol. 84, pp. 3187-3191, 2012.
- [123] A. A. Lubin et K. W. Plaxco, "Folding-Based Electrochemical Biosensors: The Case for Responsive Nucleic Acid Architectures", *Accounts of Chemical Research*, vol. 43, pp. 496-505, 2010.
- [124] A. Vallee-Belisle et K. W. Plaxco, "Structure-switching biosensors: inspired by Nature", *Curr Opin Struct Biol*, vol. 20, pp. 518-26, 2010.
- [125] A. Rachkov, S. Patskovsky, A. Soldatkin, et M. Meunier, "Surface plasmon resonance detection of oligonucleotide sequences of the rpoB genes of Mycobacterium tuberculosis", *Talanta*, vol. 85, pp. 2094-2099, 2011.
- [126] K. Arinaga, U. Rant, M. Tornow, S. Fujita, G. Abstreiter, et N. Yokoyama, "The role of surface charging during the coadsorption of mercaptohexanol to DNA layers on gold: Direct observation of desorption and layer reorientation", *Langmuir*, vol. 22, pp. 5560-5562, 2006.
- [127] R. J. White et K. W. Plaxco, "Exploiting Binding-Induced Changes in Probe Flexibility for the Optimization of Electrochemical Biosensors", *Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 73-76, 2010.
- [128] J. S. Swensen, Y. Xiao, B. S. Ferguson, A. A. Lubin, R. Y. Lai, A. J. Heeger, *et al.*, "Continuous, Real-Time Monitoring of Cocaine in Undiluted Blood Serum via a Microfluidic, Electrochemical Aptamer-Based Sensor", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, pp. 4262-4266, 2009.
- [129] A. Vallee-Belisle, F. Ricci, et K. W. Plaxco, "Thermodynamic basis for the optimization of binding-induced biomolecular switches and structure-switching biosensors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, pp. 13802-13807, 2009.
- [130] A. W. Peterson, R. J. Heaton, et R. M. Georgiadis, "The effect of surface probe density on DNA hybridization", *Nucleic Acids Research*, vol. 29, pp. 5163-5168, 2001.

- [131] E. Huang, M. Satjapipat, S. B. Han, et F. M. Zhou, "Surface structure and coverage of an oligonucleotide probe tethered onto a gold substrate and its hybridization efficiency for a polynucleotide target", *Langmuir*, vol. 17, pp. 1215-1224, 2001.
- [132] M. C. Murphy, I. Rasnik, W. Cheng, T. M. Lohman, et T. J. Ha, "Probing single-stranded DNA conformational flexibility using fluorescence spectroscopy", *Biophysical Journal*, vol. 86, pp. 2530-2537, 2004.
- [133] S. Elhadj, G. Singh, et R. F. Saraf, "Optical properties of an immobilized DNA monolayer from 255 to 700 nm", *Langmuir*, vol. 20, pp. 5539-5543, 2004.
- [134] P. O. Quintas, A. P. Cepeda, N. Borges, T. Catarino, et D. L. Turner, "Relative importance of driving force and electrostatic interactions in the reduction of multihaem cytochromes by small molecules", *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, vol. 1827, pp. 745-750, 2013.
- [135] L. Dieguez, N. Darwish, M. Mir, E. Martinez, M. Moreno, et J. Samitier, "Effect of the Refractive Index of Buffer Solutions in Evanescent Optical Biosensors", *Sensor Letters*, vol. 7, pp. 851-855, 2009.
- [136] P. Kara, K. Kerman, D. Ozkan, B. Meric, A. Erdem, Z. Ozkan, *et al.*, "Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA", *Electrochemistry Communications*, vol. 4, pp. 705-709, 2002.
- [137] X. D. Hoa, A. G. Kirk, et M. Tabrizian, "Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 23, pp. 151-160, 2007.
- [138] E. Fontana, "A novel gold-coated multimode fiber sensor", *Ieee Transactions on Microwave Theory and Techniques*, vol. 50, pp. 82-87, 2002.
- [139] P. Stocker, B. Menges, U. Langbein, et S. Mittler, "Multimode waveguide mode surface plasmon coupling: a sensitivity and device realizability study", *Sensors and Actuators a-Physical*, vol. 116, pp. 224-231, 2004.
- [140] A. Suzuki, J. Kondoh, Y. Matsui, S. Shiokawa, et K. Suzuki, "Development of novel optical waveguide surface plasmon resonance (SPR) sensor with dual light emitting diodes", *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 106, pp. 383-387, 2005.
- [141] B. S. Ferguson, S. F. Buchsbaum, J. S. Swensen, K. Hsieh, X. H. Lou, et H. T. Soh, "Integrated Microfluidic Electrochemical DNA Sensor", *Analytical Chemistry*, vol. 81, pp. 6503-6508, 2009.

ANNEXE 1 - PROPRI

ÉTÉS OPTIQUES DU BLEU DE MÉTHYLÈNE

Les valeurs de n et κ pour les formes réduites et oxydées du bleu de méthylène ne sont pas directement disponibles dans la littérature. Pour être en mesure de faire certains calculs, il est nécessaire d'avoir une valeur estimée. La seule donnée disponible est le coefficient d'extinction molaire du bleu de méthylène oxydé dans l'eau [88]:

$$A_{MB_{ox}} = 43568 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ à } 633 \text{ nm}$$

Cette valeur peut être convertie en partie imaginaire de l'indice de réfraction κ en connaissant la concentration molaire c avec:

$$230.3 A_{MB_{ox}} c = \frac{4\pi\kappa_{MB_{ox}}}{\lambda}$$

Pour estimer l'indice de réfraction du bleu de méthylène oxydé, les courbes SPR ont été mesurées avec un ellipsomètre dans des solutions de poudre de bleu de méthylène à différentes concentrations dans le 1xPBS (Figure A1.1). Connaissant le κ pour chaque concentration, les valeurs de n peuvent être estimées en trouvant le meilleur accord entre la courbe modélisée et la courbe expérimentale. Le développement de la section 2.2.3 a été utilisé pour effectuer cette modélisation. Les valeurs de n en fonction de la concentration de MB_{ox} sont résumées à la Figure A1.1 (b).

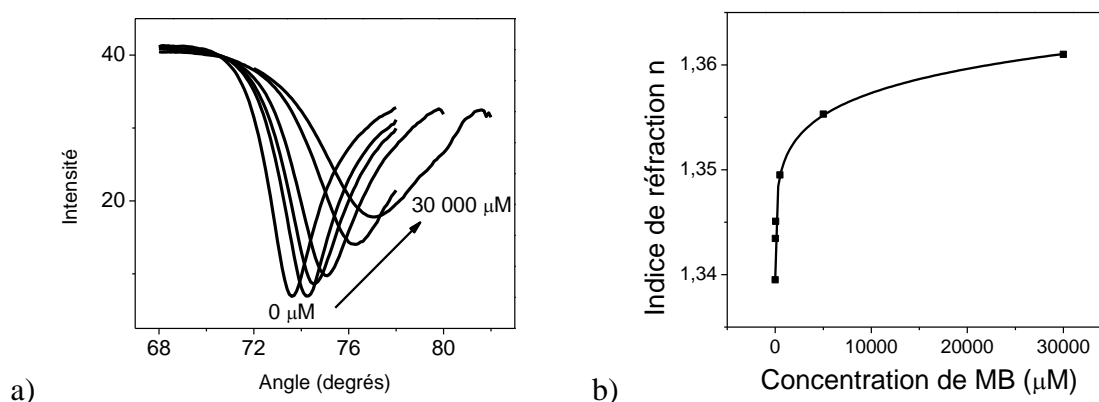


Figure A1.1 : a) Pics SPR mesurés dans des solutions de bleu de méthylène de 0, 5, 50, 500, 5000 et 30 000 μM . b) Indices de réfraction estimés en fonction de la concentration de MB oxydé dans du PBS à 633 nm.

Il a été calculé que la densité de fonctionnalisation était 10^{12} - 10^{13} interrupteurs/ cm^2 . Considérant qu'il y a un MB par interrupteur et qu'ils sont tous maintenus à ~ 1 nm de la surface dans la conformation "ON", la concentration équivalente de MB dans le volume de 1 nm près de la surface est de 16-160 mM MB:

$$\frac{10^{12} (MB)}{1 \text{ cm}^2 \times 1 \text{ nm}} \times \frac{1 \text{ m}^3}{1000 \text{ L}} = \frac{10^{12} (MB)}{10^{-10} (L)} \times \frac{(mol)}{6.022 \times 10^{23} (MB)} = 0.0166 \text{ M}$$

L'indice de réfraction de cette couche se situe donc approximativement entre les valeurs de 1.355 et 1.365, et la valeur de κ se situe entre 0.0084 et 0.084.

Parce que le MB s'oxyde lorsqu'il est en solution, les propriétés du MB_{red} peuvent difficilement être mesurées à l'ellipsomètre. Une autre méthode basée sur une modélisation multicouche des résultats expérimentaux a donc été employée. Considérons la variation d'indice de réfraction induite par la réduction de la couche mince de MB lors de la voltampérométrie cyclique. Il a été montré dans l'article que la réduction de la couche résultait en un déplacement du pic de $+0.0495^\circ$ (Figure 3.2 b). Elle a été modélisée par un milieu diélectrique entièrement composé d'eau, excepté pour une mince couche d'épaisseur 1 nm directement sur la couche d'or. Ses paramètres initiaux sont ceux du MB oxydé, avec $n_{\text{ox}}=1.365$ et $\kappa_{\text{ox}}=0.084$. L'angle de résonance SPR est alors 73.663 . Il faut trouver les nouveaux n_{red} et κ_{red} qui résulteront en un angle de résonance $73.663+0.0495^\circ=73.713^\circ$.

Le MB réduit n'absorbe pas à 633 nm, κ_{red} peut donc être posé à 0. L'indice de réfraction qui correspond à la variation d'angle de $+0.0495^\circ$ est alors $n_{\text{red}}=1.404$. Pour trouver une borne inférieure, le calcul est refait avec $n_{\text{ox}}=1.355$ et $\kappa_{\text{ox}}=0.0084$, et la valeur de $n_{\text{red}}=1.385$ est trouvée. Les paramètres approximatifs qui ont été utilisés pour les calculs dans ce mémoire sont donnés dans le tableau suivant:

Tableau A1.1 : Valeurs approximatifs de n et κ pour la couche de MB à 633 nm.

	MB _{OX}	MB _{RED}	Δ	
n	1.355-1.365	1.385-1.404	0.03-0.04	$n_{\text{ox}} < n_{\text{red}}$
κ	0.0084-0.084	0	0.0084-0.084	$\kappa_{\text{ox}} > \kappa_{\text{red}}$